

**Das Schleimhaut-assoziierte Drüsensystem des Kopfes
bei Papageienvögeln – histologische Untersuchungen
an Tieren mit und ohne Bornavirus-Infektion**

von Stefanie Janke

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Das Schleimhaut-assoziierte Drüsensystem des Kopfes bei
Papageienvögeln – histologische Untersuchungen an Tieren mit
und ohne Bornavirus-Infektion**

von Stefanie Janke

aus Altdöbern

München 2019

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Aviäre Medizin und Chirurgie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Univ.-Prof. Dr. Rüdiger Korbelt

Mitbetreuung durch: Priv.-Doz. Dr. Monika Rinder

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Rüdiger Korbel

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Johann Maierl

Tag der Promotion: 27. Juli 2019

Inhalt

I. Einleitung.....	1
II. Literaturübersicht	3
2.1.1 Respiratorische Schleimhaut	6
2.1.2 Olfaktorische Schleimhaut	9
2.1.3 Nasendrüse	13
2.2 Drüsen des Tränenapparates	19
2.2.1 Tränendrüse (<i>Glandula lacrimalis</i>).....	20
2.2.2 Nickhautdrüse (Hardersche Drüse, <i>Glandula membranae nictitantis</i>)	21
2.3. Bornaviren und ihre Krankheitsbilder bei Papageienvögeln	28
2.3.1. Familie <i>Bornaviridae</i>	28
2.3.2. Bornaviren als Erreger der Neuropathischen Drüsenmagendilatation der Papageien	30
2.3.3. Gewebetropismus der Bornaviren und experimentell verfolgte Ausbreitung im Körper	33
2.3.4. Pathologie und Histologie	35
2.3.5. Nachweismethoden der Papageien-Bornaviren	37
2.3.5.1. Virusgenom-Nachweisverfahren.....	38
2.3.5.2. Antikörper-Nachweisverfahren.....	38
2.3.5.3. Antigen-Nachweisverfahren	39
III. Material und Methoden	45
3.1. Tierauswahl	45
3.2. Probengewinnung.....	47
3.3. Verwendete Chemikalien	49
3.3.1. Alkoholreihe.....	49
3.3.2. Zamboni-Fixiermedium	50
3.3.3. Standardfärbung Hämatoxylin-Eosin.....	50
3.3.4. Spezialfärbungen.....	51
3.3.4.1. Immunhistochemische Färbung Bornavirus	51
3.3.4.2. Immunhistochemische Färbung β -III-Tubulin.....	52
3.4. Anfertigung histologischer Präparate.....	52
IV. Ergebnisse	63
3.1. Respiratorische Schleimhaut (<i>Regio respiratoria</i>).....	63
3.1.1. Wellensittich (<i>Melopsittacus undulatus</i>).....	63
3.1.2. Nymphensittich (<i>Nymphicus hollandicus</i>)	64
3.1.3. Ziegensittich (<i>Cyanoramphus novaezelandiae</i>).....	65
3.1.4. Schwarzohrpapagei (<i>Pionus menstruus</i>)	66

3.1.5. Kongo-Graupapagei (<i>Psittacus erithacus</i>).....	67
3.1.6. Amazonen	70
3.1.7. Hybridara.....	74
3.1.8. Inkakakadu (<i>Cacatua leadbeateri</i>).....	75
3.2. Nasendrüse (<i>Glandula nasalis</i>).....	77
3.2.1. Wellensittich (<i>Melopsittacus undulatus</i>).....	77
3.2.2. Nymphensittich (<i>Nymphicus hollandicus</i>)	77
3.2.3. Ziegensittich (<i>Cyanoramphus novaezelandiae</i>).....	78
3.2.4. Schwarzohrpapagei (<i>Pionus menstruus</i>).....	79
3.2.5. Kongo-Graupapagei (<i>Psittacus erithacus</i>).....	80
3.2.6. Amazonen	81
3.2.7. Aras	83
3.3. Riechepithel (<i>Regio olfactoria</i>).....	85
3.4. Tränendrüse (<i>Glandula lacrimalis</i>).....	92
3.4.1. Wellensittich (<i>Melopsittacus undulatus</i>).....	92
3.4.2. Nymphensittich (<i>Nymphicus hollandicus</i>)	93
3.4.3. Kongo-Graupapagei (<i>Psittacus erithacus</i>).....	94
3.4.4. Amazonen	95
3.4.5. Dunkelroter Ara/ Grünflügelara (<i>Ara chloropterus</i>).....	96
3.5. Hardersche Drüse/ Nickhautdrüse (<i>Glandula palpebrae tertiae</i>)	97
3.5.1. Wellensittich (<i>Melopsittacus undulatus</i>).....	98
3.5.2. Nymphensittich (<i>Nymphicus hollandicus</i>)	99
3.5.3. Ziegensittich (<i>Cyanoramphus novaezelandiae</i>).....	100
3.5.4. Prachtrosella (<i>Platycercus eximius</i>)	101
3.5.5. Schwarzohrpapagei (<i>Pionus menstruus</i>).....	102
3.5.6. Kongo-Graupapagei (<i>Psittacus erithacus</i>).....	103
3.5.7. Amazonen	104
3.5.8. Aras	106
3.5.9. Inkakakadu (<i>Cacatua leadbeateri</i>).....	108
V. Diskussion	109
VI. Zusammenfassung.....	135
VII. Summary.....	137
VIII. Literaturverzeichnis.....	139
IX. Tabellen.....	155
9.1. Tabelle A, Detaillierte Übersicht über die einzelnen untersuchten Papageienvögel	155
9.2. Tabelle B, Übersicht der klinischen Daten der Bornavirus-positiven Papageienvögel	162

9.3. Tabelle C, Angefertigte Schnittdicken bei den einzelnen Tieren und den einzelnen Blöcken	164
X. Abbildungsverzeichnis	167
XI. Tabellenverzeichnis	171
XII. Danksagung	173

Abkürzungsverzeichnis

BDV/BoDV	Borna Disease Virus
DNA	deoxyribonucleic acid, zu deutsch: Desoxyribonukleinsäure
ELISA	enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (enzyme linked immunosorbent assay)
HD	Hardersche Drüse, <i>Glandula membranae nictitantis</i>
HE	Hämatoxylin-Eosin
IHC	Immunhistochemie
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IIFA	indirect immunfluorescence assay
p. i.	<i>post infectionem</i>
p. m.	<i>post mortem</i>
p. o.	<i>per os</i>
PaBV	Parrot Bornavirus
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PDD	Neuropathische Drüsenmagendilatation (Proventricular Dilatation Disease)
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RT-PCR	reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (reverse transkriptase polymerase chain reaction)
TD	Tränendrüse
ZNS	Zentralnervensystem

I. Einleitung

Die respiratorische und die olfaktorische Schleimhaut der Nasenhöhlen von Vögeln und die damit assoziierten Drüsen im Kopfbereich, und zwar die Nasendrüse, die Tränendrüse und die Hardersche Drüse, *Glandula membranae nictitantis*, sind Bestandteile des luftleitenden Systems des oberen Respirationstraktes. In den mit respiratorischer Schleimhaut ausgekleideten luftleitenden Wegen wird die eingeatmete Luft angewärmt, angefeuchtet und von groben Schmutzpartikeln befreit. In diesem Bereich ist auch das Riechorgan lokalisiert, das durch olfaktorische Schleimhaut gekennzeichnet ist. Die Schleimhäute und Drüsen kommen direkt und als erste mit der eingeatmeten Luft in Kontakt, stellen also in vielen Fällen eine wichtige Barriere für negative Umwelteinflüsse dar, bilden aber auch eine bedeutende Eintrittspforte für Infektionserreger. Diese Strukturen spielen daher bei der Infektabwehr eine wichtige Rolle.

Auch wenn bei Vögeln von Technau erste systematische Studien zur Nasendrüse bereits im Jahr 1936 publiziert wurden und erste Studien zur Tränendrüse von Vögeln schon in den 1960er und 1970er Jahren erschienen (Bradley, 1960; Schwarze *et al.*, 1972; Aitken & Survashe, 1977), ist die histologische Struktur der respiratorischen und olfaktorischen Schleimhaut der Nasenhöhlen von Vögeln und der Nasendrüse, der Tränendrüse und der Harderschen Drüse bei Papageienvögeln im physiologischen Zustand bis auf wenige Ausnahmen noch völlig unbekannt.

Bislang ebenfalls nicht untersucht wurde, ob Bornaviren, die Erreger einer bedeutenden Erkrankung der Papageienvögel, der Neuropathischen Drüsenmagendilatation (Proventricular Dilatation Disease, PDD), diese Gewebe infizieren, wie es bereits für das Borna Disease Virus bei Säugetieren nachgewiesen wurde. Die PDD ist durch das Auftreten gastrointestinaler Symptome und zentralnervöser Ausfallerscheinungen gekennzeichnet. Viele Aspekte der Pathogenese und der Infektionsübertragung sind aber auch rund zehn Jahre nach der Entdeckung der Bornaviren als Erreger der PDD noch unbekannt.

In der vorliegenden Arbeit sollte daher zunächst bei Vögeln der zoologischen Ordnung Psittaciformes die physiologische Histologie der respiratorischen und olfaktorischen Schleimhaut der Nasenhöhlen und der assoziierten Drüsen im

Kopfbereich, und zwar der Nasendrüse, Tränendrüse und Harderschen Drüse, bei einem möglichst breiten Spektrum von Vogelspezies beschrieben werden und anschließend bei natürlich infizierten Papageienvögeln untersucht werden, ob in diesen Geweben Bornavirus-Antigen mittels Immunhistochemie nachweisbar ist. Zudem sollte untersucht werden, ob bei den infizierten Vögeln dort histopathologische Veränderungen auftreten.

II. Literaturübersicht

2.1 Oberer Respirationstrakt und assoziierte Drüsen

Der Atmungsapparat des Vogels dient, wie bei anderen Wirbeltieren auch, primär dem Zweck der Aufnahme von Sauerstoff aus der Außenwelt in den Körper, um den aeroben zellulären Stoffwechsel zu erhalten und das Kohlendioxid, das Produkt der inneren Zellatmung, an die Luft auszuscheiden (Liebich & Zengerling, 2010). Der Respirationstrakt besteht aus zwei funktionell und strukturell unterschiedlichen Abschnitten, dem luftleitenden und dem respiratorischen System. Das luftleitende System wird beim Vogel von der Nasenhöhle, *Cavum nasi*, dem Kehlkopf, *Larynx*, der Luftröhre, *Trachea*, und dem vogelspezifischen Stimmkopf, *Syrinx*, am Übergang zwischen Trachea und den beiden Hauptbronchien gebildet (König *et al.*, 2016). Eine Besonderheit der Vögel sind die Luftsäcke. Es lassen sich, je nach Vogelart verschieden, maximal acht unterschiedliche Luftsäcke unterscheiden (Halsluftsack, *Saccus cervicalis*; Schlüsselbeinluftsack, *Saccus clavicularis*; paariger vorderer Luftsack, *Saccus thoracicus cranialis*; paariger hinterer Brustluftsack, *Saccus thoracicus caudalis*; paariger Bauchluftsack, *Saccus abdominalis*), die blasebalgähnlich an die Lunge angeschlossen, mit der Umgebung verwachsen sind und teilweise Knochen pneumatisieren (Vollmerhaus & Sinowatz, 2004; König *et al.*, 2016).

Das respiratorische System der Vögel umfasst dabei die beiden volumenkonstanten Lungen, *Pulmo dexter* und *Pulmo sinister* (Vollmerhaus & Sinowatz, 2004; König *et al.*, 2016), mit dem Bronchialsystem, bestehend aus Hauptbronchien, *Bronchi primarii*; Sekundärbronchien, *Bronchi secundarii*; Parabronchien, *Parabronchi*, und Luftkapillaren, *Pneumocapillares* (König *et al.*, 2016). Die Bauchluftsäcke sind an das Ende der Hauptbronchien angeschlossen, die restlichen Luftsäcke stehen mit Sekundärbronchien in Verbindung (Vollmerhaus & Sinowatz, 2004; König *et al.*, 2016).

Der obere Respirationstrakt ist ein Teil des Atmungsapparates und dient als luftleitender Weg, in welchem das ein- und ausgeatmete Gasgemisch transportiert wird (Liebich & Zengerling, 2010). In der Nase bzw. dem Schnabel wird die

eingeatmete Luft angewärmt und angefeuchtet, hier werden grobe Schmutzpartikel gefiltert und zusätzlich sitzt auch das *Organum olfactus* mit der Riechschleimhaut in diesem Areal (Vollmerhaus & Sinowatz, 2004; Liebich & Zengerling, 2010). Die in diesem System vorhandene respiratorische Schleimhaut leistet zusammen mit der Schleimhaut der Schnabelhöhle und des Rachens einen wichtigen Beitrag zur Temperaturregulation (Wurzinger, 2005).

Zum oberen Respirationstrakt gehören der Schnabel mit den Nasenlöchern und den Nasenhöhlen, sowie der Rachen. Die beiden Nasenhöhlen, *Cava nasi*, sind durch die Knochenspannen der umgebenden *Ossa faciei* begrenzt (Vollmerhaus & Sinowatz, 2004). Das *Septum nasi*, die Nasenscheidewand, ist knöchern oder knorpelig und trennt die beiden Nasenhöhlen voneinander (Vollmerhaus & Sinowatz, 2004; König *et al.*, 2016). Gänse und Enten haben im *Septum nasi* ein getreidekorngroßes Loch, in der Höhe der Nasenlöcher gelegen, daher haben sie *Nares perviae*. Anderen Vögeln fehlt diese Öffnung, sie haben *Nares imperviae* (Vollmerhaus & Sinowatz, 2004; König *et al.*, 2016). Die knöchernen Eingänge in die Nasenhöhle werden durch Weichteile zu spaltförmigen Nasenlöchern, *Nares*, verengt (Vollmerhaus & Sinowatz, 2004). Als Schutzvorrichtungen sind je nach Vogelart Borstenfedern, Hautfalten oder Deckplatten, *Opercula*, vorhanden (Vollmerhaus & Sinowatz, 2004; König *et al.*, 2016). Bei Tauben wird die obere Knorpelplatte von einem als Schild bezeichneten Hautwulst bedeckt, bei Gänsen und Enten ist die Knorpelplatte über dem Naseneingang auf der Außenfläche von einer Wachshaut bedeckt (Vollmerhaus & Sinowatz, 2004). Es gibt bei diversen Vogelarten zahlreiche Spezialausformungen der Nasenlöcher: Kiwis haben als nachtaktive Laufvögel ein gutes Riechvermögen und ihre Nasenlöcher sitzen an der Schnabelspitze. Bei Sturmvögeln sind die Nasenlöcher zu röhrenartigen Gebilden umgestaltet, bei Fischfressern sind sie sehr eng. Bei den Tölpeln als Stoßtaucher sind die Nasenlöcher völlig verwachsen, diese Vögel sind auf Mundatmung angewiesen. Eine weitere Sonderform bildet das sogenannte „Nasenkorn“ der Falkenvögel, eine funktionelle Anpassung zur Vermeidung eines zu hohen Druckaufbaus im oberen Atemwegsbereich bei hohen Fluggeschwindigkeiten, wie z. B. im Stoß beim Jagdflug. Durch das Einragen in die Nasenhöhle bewirkt das

Nasenkorn eine Luftverwirbelung, welche als Schutzvorrichtung fungiert (Vollmerhaus & Sinowatz, 2004; König *et al.*, 2016).

Vögel besitzen zwei bis drei Nasenmuscheln, *Conchae nasalis*, bei den Hühnern gibt es zusätzlich noch die *Lamella verticalis naris*, die von der unteren knorpeligen Nasenlochbegrenzung als dorsal offene, conchenähnliche Falte in den Nasenvorhof hinein ragt (Vollmerhaus & Sinowatz, 2004). Die Nasenmuscheln liegen bei Vögeln hintereinander und nicht wie bei Säugetieren übereinander gestapelt, daher werden sie als *Concha nasalis rostralis*, *media* und *caudalis* bezeichnet (Vollmerhaus & Sinowatz, 2004; König *et al.*, 2016). Die *Concha nasalis rostralis* entspringt der Lateralwand des Nasenvorhofs, sie stellt einen im Querschnitt C-förmigen Konus dar, wobei die Spitze rostral gerichtet ist. Diese Knorpellamelle wird von kutaner Schleimhaut bedeckt und fehlt manchen Vogelarten (z. B. Tölpeln) (Vollmerhaus & Sinowatz, 2004). Die *Concha nasalis media* ist die größte der drei Nasenmuscheln, sie ist schneckenhausförmig nach ventral eingerollt. Beim Haushuhn werden 1,5 Windungen beschrieben, beim Wassergeflügel 2 bis 2,5 Windungen und bei der Taube kann nur eine ventral gerichtete Lamelle ohne Einrollung dargestellt werden (Vollmerhaus & Sinowatz, 2004). Diese Knorpellamelle ist mit respiratorischer Schleimhaut überzogen (Vollmerhaus & Sinowatz, 2004). Die *Concha nasalis kaudalis* ist bei den Hausvogelarten kleiner als die mittlere Nasenmuschel, Tauben und Taggreifvögeln fehlt sie (Vollmerhaus & Sinowatz, 2004). Sie basiert auf dem Nasengrund und der Lateralwand und bildet eine rostral gerichtete, geschlossene Knorpelblase (Vollmerhaus & Sinowatz, 2004). Beim Huhn ist sie halbkugelförmig, bei Gans und Ente unregelmäßig geformt (Vollmerhaus & Sinowatz, 2004). Diese Nasenmuschel trägt auf ihrer nasalen Oberfläche die olfaktorische Schleimhaut und mündet mit ihrem kaudolateral gelegenen Zugang in den *Sinus infraorbitalis* (Vollmerhaus & Sinowatz, 2004).

Die ausgebildeten Nasengänge, *Meatus nasi*, sind homolog zu den Säugetieren (Vollmerhaus & Sinowatz, 2004). Am weitlumigsten ist der Nasengang im Bereich vor und unter der *Concha nasalis media*, in diesem Bereich endet auch der *Ductus nasolacrimalis*, der das Sekret der Tränendrüse ableitet (Vollmerhaus & Sinowatz,

2004; König *et al.*, 2016). Versteckt im Nasengrund unter der mittleren Nasenmuschel liegt die *Apertura sinus infraorbitalis*. Beim Vogel sind die Schädelknochen pneumatisiert, ihre kleinen Divertikel stehen zumeist mit den Nasengängen, aber auch mit der Paukenhöhle in Verbindung (Vollmerhaus & Sinowatz, 2004). Aus der Nasenhöhle gelangt die Atemluft über die beidseitigen Ausgänge, die von *Vomer* und *Septum nasi* getrennt sind, in einen gemeinsamen, vom Gaumenbein flankierten Raum und dann durch die weite *Pars caudalis* der *Choana*, während die spaltförmig enge *Pars rostralis* der Choanenspalte bei der Atmung durch die Zunge verschlossen werden kann (Vollmerhaus & Sinowatz, 2004).

Der *Sinus infraorbitalis* der Vögel darf nicht mit dem *Sinus maxillaris* der Säugetiere verglichen werden (Vollmerhaus & Sinowatz, 2004). Der Zugang erfolgt über die *Apertura sinus infraorbitalis* von der Nasenhöhle aus, doch nur sein schnabelwärts gerichteter kleiner Anteil schiebt sich zwischen das *Os maxillare* und das *Os nasale* ein. Der größere Anteil erstreckt sich als häutiger Sack unter den Augapfel und kann bei älteren Tieren auch auf dessen Kaudalfläche gelangen (Vollmerhaus & Sinowatz, 2004; König *et al.*, 2016). Bei der Gattung *Ara* ist dieses paranasale Sinussystem stark gegliedert, es gibt am Kopf mehrere Buchten, die sich nahe des *Os zygomaticum* vor, hinter und ventral des Auges sowie medial der *Mandibula* und bis weit in die Tiefen des Halsbereichs ausdehnen (König *et al.*, 2016).

2.1.1 Respiratorische Schleimhaut

Die *Regio respiratoria* nimmt den größten Teil der Nasenhöhle ein und ist mit respiratorischem Epithel bedeckt, das durch ein mehrstufiges, hochprismatisches Flimmerepithel mit Becherzellen gebildet wird (Vollmerhaus & Sinowatz, 2004; Weyrauch *et al.*, 2009; Hoffmann, 2010). Sie bedeckt Nasenmuscheln, Nasengänge und die Nasenscheidewand, außerdem die laterale Fläche des Vomeronasalorgans bei Säugern. Ihre Auskleidung, die Nasenschleimhaut, wird als *Pars respiratoria* bezeichnet und folgt nach der *Pars cutanea*, die den Nasenvorraum, *Vestibulum*

nasi, einschließt (Vollmerhaus & Sinowatz, 2004; Hoffmann, 2010). In diesem ersten luftleitenden Abschnitt des Atmungsapparates von der Nasenhöhle bis in die Bronchiolen (ausgenommen Pharynx und Larynx) wird die Atemluft gefiltert, temperiert und befeuchtet (Vollmerhaus & Sinowatz, 2004; Hoffmann, 2010; Liebich & Zengerling, 2010). Die *Pars olfactoria* umfasst nur einen kleinen Bereich im hinteren Teil der Nasenhöhle, auf dem das Sinnesepithel sitzt (Vollmerhaus & Sinowatz, 2004; Liebich & Zengerling, 2010).

Auf dem Weg von außen durchströmt die Luft zunächst den Übergangsbereich der *Pars cutanea*, bis sie in die *Regio respiratoria* gelangt. Im *Vestibulum nasi* hinter den Nasenlöchern ist dabei zunächst ein mehrschichtiges, verhorntes Plattenepithel zu finden. Darin enthalten sind auch Talg- und Schweißdrüsen sowie beim Säugetier *Vibrissae* (Wurzinger, 2005; Sinowatz & Hees, 2012). Häufig ist dieser Bereich pigmentiert, das untergelagerte Bindegewebe der *Lamina propria mucosae* ist derb-elastisch und steht über lamellär geschichtete Faszien der Muskulatur bzw. der Knorpelhaut in enger Verbindung (Liebich & Zengerling, 2010). Es folgt ein schmaler Streifen mit mehrschichtigem, hochprismatischem Epithel, das den Übergang ins respiratorische Epithel darstellt (Wurzinger, 2005; Weyrauch *et al.*, 2009; Sinowatz & Hees, 2012).

Laut Sinowatz & Hees (2012) beträgt die Höhe der respiratorischen Schleimhaut beim Menschen zwischen 0,5 mm und 3 mm, bei Tieren lassen sich keine absoluten Zahlen finden.

Auch die Nasennebenhöhlen sind mit respiratorischer Schleimhaut ausgekleidet, allerdings finden sich dort weniger Drüsen und Becherzellen, ein Venenplexus fehlt, das Epithel weist eine geringere Dicke und Epithelhöhe auf und hat eine feste Verbindung mit dem Periost (Wurzinger, 2005; Sinowatz & Hees, 2012).

Im unteren Nasengang mündet der Tränennasengang, er wird ausgekleidet von zweireihigem, prismatischem Epithel (Sinowatz & Hees, 2012).

Das respiratorische Epithel dient nicht dem Gasaustausch, sondern der Anfeuchtung und Reinigung der Atemluft von groben Partikeln. Dabei bildet es die

Lamina epithelialis der *Tunica mucosa*, darunter liegt die *Lamina propria* der Schleimhaut (Wurzinger, 2005).

Im respiratorischen Epithel finden sich viele Becherzellen und mehrzellige, endoepitheliale Schleimdrüsen (Sinowatz & Rodler, 2011; Sinowatz & Hees, 2012). Die Becherzellen sind die zweithäufigsten Zelltypen im respiratorischen Epithel. Apikal enthalten sie Vesikel, deren polysaccharidhaltiges Sekret bedeutend zur Schleimtapete auf der Schleimhautoberfläche beiträgt. In dem als Nassfilter fungierenden Schleim setzen sich gasförmige Bestandteile der Atemluft, Stäube und Mikroben ab (Wurzinger, 2005). Die kontinuierliche Basalmembran ist deutlich zu sehen (Aughey & Frye, 2001; Sinowatz & Hees, 2012). Wurzinger (2005) bezeichnete die Basalmembran als auffallend dick (mehrere Mikrometer), nannte aber keine absoluten Zahlen. Zudem stehen alle Zellen mit der Basalmembran in Kontakt. Weil aber nicht alle die Oberfläche erreichen, sind Kerne in unterschiedlicher Höhe zu finden (Wurzinger, 2005; Sinowatz & Rodler, 2011). Die Basalzellen sind undifferenzierte, rundliche Stammzellen. Sie erreichen nicht die Oberfläche des Epithels, teilen sich aber oft und differenzieren sich zu anderen Zellen des respiratorischen Epithels (Wurzinger, 2005). Es treten keine Bindegewebspapillen auf, aber es lassen sich kollagene und fibröse Fasern darstellen (Aughey & Frye, 2001; Sinowatz & Hees, 2012).

Die Epithelzellen werden von säulenförmigen Flimmerzellen mit Kinozilien gebildet, diese schlagen bei Flimmerbewegungen in Richtung Choane und transportieren somit Material in den Schlund (Aughey & Frye, 2001; Wurzinger, 2005; Liebich & Zengerling, 2010; Sinowatz & Rodler, 2011; Sinowatz & Hees, 2012). Dieses Zusammenspiel aus nasal und rachenwärts schlagenden Kinozilien und dem Schleim der Becherzellen wird als Mukuziliarstrom bezeichnet (Hoffmann, 2010).

Die Mikrovilli tragenden Bürstenzellen sind hochprismatisch und bilden eine heterogene Zellpopulation. An der Basis können sie Kontakt zu afferenten Nervenendigungen haben und somit Sinneszellen für Nies- und bei Säugern auch Hustenreflex darstellen. Manche sind auch Vorläufer für Becherzellen oder

zilientragende Zellen und ersetzen diese (Wurzinger, 2005; Liebich & Zengerling, 2010).

Die *Lamina propria* besteht aus sehr zellreichem, lockerem, retikulärem, subepithelialen Bindegewebe (Wurzinger, 2005; Sinowatz & Hees, 2012). Es sind Fibroblasten, Lymphfollikel und viele freie Zellen, vor allem Lymphozyten, Makrophagen, Granulozyten und Plasmazellen zu beobachten (Wurzinger, 2005; Liebich & Zengerling, 2010; Sinowatz & Hees, 2012). An mehrere Stellen sind Geflechte mit weitlumigen Venen zu erkennen, sie dienen als Schwellkörper. In der muskelstarken Wand stellt das Kapillarnetz die Vorwärmung der Atemluft sicher. Alle Gefäße sind in der Durchblutung stark variabel und können reguliert werden (Wurzinger, 2005; Sinowatz & Hees, 2012). Durch ein Anschwellen der weitlumigen Drosselvenen und arteriovenöse Anastomosen kann durch eine Einengung des Lumens eine Regulation der Luftströmung erfolgen (Hoffmann, 2010). Als *Glandulae nasales* werden die verzweigten tubuloazinösen, serösen, mukösen und seromukösen Drüsen bezeichnet, die unter der *Lamina propria* liegen und durch das Epithel mit kurzen Ausführungsgängen ins Lumen sezernieren (Aughey & Frye, 2001; Wurzinger, 2005; Hoffmann, 2010; Sinowatz & Rodler, 2011; Sinowatz & Hees, 2012). Hoffmann (2010) beschreibt dort auch zusätzlich lymphatisches Gewebe.

2.1.2 Olfaktorische Schleimhaut

Das Riechorgan, *Organum olfactus*, wird gebildet von der *Regio olfactoria tunicae mucosae nasi* (kaudaler pigmentierter Nasengrund), dem *Organum vomeronasale* (Jacobson Organ) soweit vorhanden, und den kaudalen Anteilen der Siebbeinmuscheln. Diese sind mit olfaktorischem Epithel bedeckt. Charakteristisch ist das Fehlen eines Venenplexus (Seeger, 2010). Die *Regio olfactoria* ist lokalisiert an der Oberfläche der Ethmoturbinalia, der dorsalen Endoturbinalia und an Teilen des hinteren Nasenseptums (Weyrauch *et al.*, 2009; Liebich, 2010). Diese Region wird bei normaler Atmung nicht umströmt sondern nur bei bewusstem Schnüffeln durch Luftverwirbelungen erreicht (Wurzinger, 2005). Die Ausdehnung der

Riechschleimhaut zeigt starke tierartliche Unterschiede (Weyrauch *et al.*, 2009; Sinowatz & Rodler, 2011). Beim Menschen beschreiben Sinowatz & Hees (2012) eine Fläche von 500 mm² und mit 60 µm eine im Vergleich zum respiratorischen Epithel etwas dickere Schleimhaut. Die *Regio olfactoria* wird bedeckt von der *Tunica mucosa olfactoria*, die aus dem *Epithelium olfactorium* und der *Lamina propria mucosae* besteht (Liebich, 2010). Das einschichtige, mehrreihige, hochprismatische Epithel mit primären Sinneszellen (bipolare Nervenzellen, Riechzellen, *Epitheliocyti neurosensorii olfactorii*), die das 1. Neuron der Riechleitung bilden, wird von Stütz- und Basalzellen ergänzt (Liebich, 2010; Seeger, 2010; Sinowatz & Rodler, 2011). Auf den Sinneszellen finden sich apikal Riechhärchen (modifizierte Zilien), die zum Binden der Geruchsstoffe dienen (Sinowatz & Rodler, 2011). Ein Riechhärchen misst beim Menschen ca. 2 µm (Hees, 2006), bei den Haussäugetieren werden 50 bis 100 µm angegeben (Liebich, 2010). Das Axon der bipolaren Riechzellen als 1. Neuron der Riechleitung zieht durch die Basalmembran. Dahinter vereinigt es sich mit benachbarten Axonen zu den *Nervi olfactorii* (Sinowatz & Rodler, 2011). Diese markhaltigen *Fila olfactoria* (Riechfäden) sind in der *Tunica submucosa* gelegen (Liebich, 2010). Diese bündeln sich im Verlauf zum *Nervus olfactorius* (I), der tritt als dünner Nerv durch das *Foramen orbitonasale mediale* in die *Orbita* und verläuft dort am *Septum interorbitale* zum kleinen *Foramen nervi olfactorii*, tritt hier in die *Fossa bulbi olfactorii* der *Fossa cranii rostralis* und nimmt durch den *Bulbus olfactorius* Kontakt mit dem Großhirn auf (Frewein, 2004; Vollmerhaus, 2004). Sinowatz & Rodler (2011) geben an, dass die Axone der Riechzellen in den *Bulbus olfactorius* eintreten und sich danach aufzweigen. Aus diesen Endverzweigungen bilden sich zusammen mit den Pinsel- und Mitralzellen die *Glomerula olfactoria*. Die Pinsel- und Mitralzellen stellen hierbei die sekundären Neuronen der Riechbahn dar und verbinden synaptisch die Riechzellen (Sinowatz & Rodler, 2011).

Das olfaktorische Epithel enthält keine Becherzellen, sondern Bowman-Drüsen (Wurzinger, 2005; Weyrauch *et al.*, 2009). Die Bowman-Drüsen, auch *Glandulae olfactoriae* genannt, liegen in der *Lamina propria mucosae* und sind tubuloazinäre, seröse Drüsen (Liebich, 2010; Seeger, 2010, Sinowatz & Rodler, 2011). Sie enthalten Proteasen, die essentiell wichtig sind zum Aufschlüsseln von

wahrzunehmenden Riechstoffen und deren Anheftung an der Oberfläche der Sinneszellen. Zusätzlich führen sie eine Spülfunktion aus, um nachfolgende Sinneseindrücke zu ermöglichen (Liebich, 2010).

Aughey & Frye (2001) beschreiben das Aneinanderstoßen von braun-gelbem, olfaktorischem Epithel an rosanes, respiratorisches Epithel. Sinowatz & Rodler (2011) sehen jedoch keine scharfe Grenze zwischen den beiden Regionen. Die Riechregion ist bei Vögeln meist gelblich gefärbt, bei Hühner- und Wasservögeln liegt diese kleine, nicht scharf begrenzte Zone auf der *Concha nasalis caudalis* und dem hinteren *Septum nasi* (Frewein & Sinowatz, 2004; König *et al.*, 2016; Liebich & Zengerling, 2010). Sowohl Riechschleimhaut als auch Riechhirn sind bei Vögeln meist nur klein und funktionell nur schwach ausgebildet, da nach allgemeiner Auffassung der Geruchssinn bei den meisten Vögeln keine sehr große Rolle spielt (König *et al.*, 2009). Nur bei fisch- oder fleischfressenden Vögeln, Kiwis und einigen Enten- und Gänsearten gilt er als verhältnismäßig gut entwickelt (König *et al.*, 2009; Liebich, 2010).

Das olfaktorische Epithel ist einschichtig, mehrreihig und besteht aus drei Zelltypen: Sinneszellen (*Epitheliocyti neurosensorii olfactorii*), Stützzellen (*Epitheliocyti sustentantes*) und Basalzellen (*Epitheliocyti basales*) (Aughey & Frye, 2001; Weyrauch *et al.*, 2009; Liebich, 2010). Dabei werden die Sinneszellen permanent erneuert, sie sind Nervenzellen mit großem Regenerationspotential (Seeger, 2010).

Die Sinneszellen sind bipolare Nervenzellen, ihre Perikaryen sind intraepithelial lokalisiert, die großen, polygonalen, dunklen Zellkerne liegen im mittleren Epithelbereich (Liebich, 2010; Seeger, 2010; Sinowatz & Rodler, 2011). Diese Zellen sind birnen- bis flaschenförmig, außen werden die Sinneszellen von Stützzellen umgeben (Liebich, 2010). Die freie Oberfläche des dendritischen Nervenfortsatzes ist kolbenartig verdickt (*Bulbus dendriticus*) (Weyrauch *et al.*, 2009) und wird auch Sinneskolben genannt. Darauf sitzen 8-20, bei Hunden auch mehr, Riehhärchen (Sinnenhärchen, Zilien) (Liebich, 2010). Weyrauch *et al.* (2009) beschreiben 10-30 Riehhärchen, die sich an der Epitheloberfläche zwischen den Mikrovilli benachbarter Stützzellen ausbreiten.

Die Zilien sind Träger der chemischen Rezeptoren für Duftstoffe (Liebich, 2010; Seeger, 2010). Sie bestehen aus einem dickeren Anfangsteil mit Bau einer Kinozilie (9+2 -Muster), distal finden sich dann aber nur noch zwei Mikrotubuli (Liebich, 2010). Sie haben bei den Haussäugetieren eine Länge von 50 bis 100 µm und sind von einer dünnflüssigen Schleimschicht umgeben, die aus den Stützzellen und den Drüsen der respiratorischen Schleimhaut stammt. Darin können Geruchsstoffe aufgenommen und gelöst werden (Liebich, 2010). Bei chemischer Reizung wird das Rezeptorpotential in Aktionspotential umgewandelt, über das Perikaryon findet eine Weiterleitung zum efferenten Axon statt, welches basal aus dem Perikaryon austritt (Liebich, 2010). Nach dem Durchbrechen der Basalmembran bündelt sich das Axon mit anderen zu markhaltigen *Fila olfactoria*, welche zur *Lamina cibrosa* des Siebbeins ziehen und als *Glomerula olfactoria* im *Bulbus olfactorius* enden (Liebich, 2010; Sinowatz & Rodler, 2011). Seeger (2010) und Weyrauch *et al.* (2009) beschreiben diese Riechfäden (*Fila olfactoria*) dagegen als marklose sensible Nervenfasern.

Die Stützzellen sind hochprismatische Zellen, sie haben Kontakt mit der Basallamina und durchziehen das Epithel. An ihrer freien Oberfläche finden sich zahlreiche, unregelmäßig verzweigte Mikrovilli (Liebich, 2010; Seeger, 2010). Ihre hellen Kerne sind länglich und apikal gelegen (Seeger, 2010; Sinowatz & Rodler, 2011). Intraepithelial erfüllen sie die Funktion einer Gliazelle, unterstützen also die Neuronen ohne selbst Erregungspotential zu leiten, zudem sezernieren sie durch Exozytose schleimähnliche Stoffe, die reich an Organellen sind (Liebich, 2010). Durch feine Pigmenteinlagerungen im Zytoplasma sorgen sie für die charakteristische, dunkle Farbe des Riechepithels (Liebich, 2010; Seeger, 2010).

Basalzellen sind eng an der Basalmembran anliegende kleine Zellen, stellenweise auch verzweigt. Sie sind nicht spezialisiert, teilen sich durch Mitose und differenzieren sich zu Stützzellen (Liebich, 2010). Ihre Kerne sind dunkel und basal gelegen (Seeger, 2010; Sinowatz & Rodler, 2011).

Die Riechschleimhaut wird von lockerem Bindegewebe unterlagert, darin finden sich markhaltige Nervenfaserbündel, Gefäße und Bowman-Drüsen. Diese münden mit langen Ausführungsgängen auf der Oberfläche des Epithels (Liebich, 2010).

Die Bowman-Drüsengänge beschreiben Aughey & Frye (2001) als einfach und kubisch ausgekleidet.

2.1.3 Nasendrüse

Die Nasendrüse, auch *Glandula nasalis* genannt, wurde bei einigen Wasservögeln durch ihre auffällige supraorbitale Lage schon früh entdeckt (Technau, 1936). Jacobson (1813) verfasste die erste spezielle Abhandlung über dieses Organ, das er in Anlehnung an Mammalia „*glande laterale de Stenson*“ nannte. Ihm gelang die Darstellung des Ausführungsganges bis zur Mündungsstelle in der Nasenhöhle. Ihr Sekret soll vor allem beim Flug den Naseneingang und die Nasenhöhle vor dem Austrocknen schützen (Vollmerhaus & Sinowatz, 2004; König *et al.*, 2016; Liebich & Zengerling, 2010). Den Namen „Nasendrüse“ erhielt sie von Nitzsch (1820), dem auch schon eine wechselnde Lage und Ausdehnung der Drüse bei verschiedenen Vogelarten auffiel. Die Drüse trägt zahlreiche Beinamen wie Salzdrüse (Nitzsch, 1820; King & McLelland, 1975), bei den Mammalia wird sie auch als Stenson'sche oder kurz Steno Drüse bezeichnet (Nitzsch, 1820; Dauborn, 2014).

Die Nasendrüse ist eine merokrine, zusammengesetzte oder einfache tubulöse Drüse. Sie besteht meist aus zwei paarigen, gesonderten Drüsenkörpern in einer gemeinsamen, bindegewebigen Hülle (Technau, 1936). Die Nasendrüse erstreckt sich mit ihrem lateralen Teil über die dorsale Seite des Augapfels rostral bis in die seitliche Nasenhöhlenwand (King & McLelland, 1975; Dauborn, 2014). Die Lage wird von Reese *et al.* (2009) und Liebich & Zengerling (2010) dorsonasal in der Orbita beschrieben. Sie liegt in einer Knochenvertiefung auf dem Stirnbein und ist paarig angelegt. Allgemein kann sie in einen *Lobus lateralis* und einen *Lobus medialis* unterteilt werden, wobei jeder Lappen einen eigenen Ausführungsgang aufweist (Technau, 1936; König *et al.*, 2016). Die Ausführungsgänge verlaufen dem *Processus maxillaris*, selten dem *Processus praemaxillaris*, des *Os nasale* von innen und der lateralen Wand der Nasenhöhle von außen anliegend nach vorne unten bis zur Region der occipitalen Vorhofbegrenzung (Technau, 1936). Die Ausführungsgänge und ihre Mündung in die Nasenhöhle sind immer im hinteren

Teil des Nasenvorhofes zu finden, diese Lokalisation ist bei allen untersuchten Vogelarten gleich (Technau, 1936). Korbel (2000), König *et al.* (2016) und Reese *et al.* (2009) legen die Mündung schlitzförmig auf der Nasenscheidewand nahe der rostralen Nasenmuschel fest, während Technau (1936) die Mündung des lateralen Ganges auf der Medialseite der Vorhofmuschel hinten unten und die Mündung des medialen Ganges an der Nasenscheidewand occipital gegenüber beschreibt. Die Ausführungsgänge werden von einer Lage großkerniger Zylinderzellen mit basal liegenden Kernen ausgekleidet, diese sind umschlossen von einer Schicht kleiner, dicht gedrängter Zellen. Weder in den Tubuli noch in den Auskleidungen der Tubenkanäle finden sich Becherzellen (Technau, 1936).

Es muss jedoch beachtet werden, dass die Ausdehnung des Drüsenkörpers bei den verschiedenen Spezies stark variiert. Technau (1936) untersuchte 106 Gattungen aus 49 Familien und 44 Ordnungen (alle Ordnungen außer *Apteryges*, *Mesoenades*, *Rhinoceti*, *Momoti*) und musste dabei eine starke Variation feststellen. Er unterteilte drei unterschiedliche anatomische Lagen der Nasendrüse:

I Prae-orbitale Lage (in der Kieferhöhle bzw. im *Sinus orbitalis*, der *Orbita* vorgelagert)

II Orbitale Lage (in der *Orbita* oder ihrem Rand aufliegend, Drüsenkörper an fünf verschiedenen anatomischen Positionen möglich):

- a) praeorbital – interorbital: im Übergang zwischen Kieferhöhle und Augenhöhlen
- b) interorbital: im Rostralteil der Augenhöhle
- c) interorbital – exorbital: rostral in der Augenhöhle und occipital dem Rande ihres Daches anliegend
- d) exorbital: am Rande des Orbitaldaches dem Bulbus aufliegend
- e) exorbital – supraorbital: lateral dem Bulbus, medial dem Praefrontale ohne Grubenbildung aufliegend

III Supraorbitale Lage (auf dem *Os praefrontale* in stark geschlossenen oder seitlich offenen Supraorbitalgruben gelegen)

(Technau, 1936)

Fast alle von ihm untersuchten Vögel ließen sich in eine dieser Kategorien einteilen, nur wenige Ausnahmen wurden beschrieben. Bei lediglich fünf der von ihm untersuchten Präparate konnte er keine Nasendrüse finden: Opisthocomi (Zigeunerhuhn, *Opisthocomus hoatzin*), Pterocletes (Flughuhn, *Pterocles gutturalis*), Casuarii (Kasuar, *Casuarius uniappendiculatus*) und Anhimae (Wehrvogel, *Anhima cornuta*, *Chauna chavaria*) (Technau, 1936). Zusätzlich gab es zwei Arten, Tukan (*Ramphastos erythrorhynchos*) und Schuhschnabel (*Balaeniceps rex*), bei denen die Umbildung des Nasenvorhofes den Wegfall der Nasendrüse bedingte, weil keine Abflussmöglichkeit bestand (Technau, 1936). In der Literatur finden sich Aussagen, dass Tauben (keine genaue Spezies benannt) keine Nasendrüse haben (Nitzsch, 1820; Reese *et al.*, 2009). Dies ist laut Technau nicht korrekt, allerdings ist die Nasendrüse bei der von ihm untersuchten Ringeltaube (*Columba palumbus*) nur sehr klein ausgebildet, der Drüsenkörper stellt sich lediglich als eine Verdickung des Ausführungsganges dar (Technau, 1936).

Technau (1936) stellte auch fest, dass der Drüsenkörper näher an der Öffnung des Ausführungsganges liegt, wenn die Drüse nur klein ausgebildet ist. Durch die Verlagerung der größer ausgebildeten Drüsenkörper ist der Ausführungsgang bei anderen Arten länger ausgebildet. Bei manchen Vogelarten sind nur winzige Knötchen oder Läppchen an der lateralen Nasenhöhlenwand zu finden. Bei anderen Zwischenformen, die je nach der Größe ihres ausgebildeten Drüsenkörpers immer weiter zum *Os praefrontale* verlagert sind, liegt der Drüsenkörper in zahlreichen Positionen auf dem Weg zwischen dem Mündungsgebiet der Ausführungsgänge im hinteren Teil des Nasenvorhofes und der Lage der vollausgebildeten Drüsen auf dem Praefrontale (siehe Beschreibungen der anatomischen Lagen I bis III weiter oben im Text, Technau, 1936).

Bei einigen Vogelarten wurde nachgewiesen, dass über die Nasendrüse Natriumchlorid abgegeben werden kann. Diese Funktion besitzt vor allem bei Seevögeln für die Regulierung des Wasserhaushaltes eine große Bedeutung. In mehreren Versuchen konnte nachgewiesen werden, dass sich bei Wasservögeln die Drüse bei haltungsbedingtem Kontakt mit Salzwasser stärker ausbildet, während

bei fehlendem Kontakt eine Rückbildung erfolgt (Schiöler, 1925; Heinroth, 1927; Schildmacher, 1932).

Der Nasendrüse wird auch bei Wüstenspezies, wie den Straußenvögeln, und bei Falkenvögeln eine osmoregulatorische Funktion zugeschrieben. Sie ermöglicht den Vögeln bei begrenztem Frischwasservorkommen in ihrem Lebensraum, hohem Wasserverlust durch Verdunstung oder hohem Gehalt an Natriumchlorid in der Nahrung ihren Wasserhaushalt ausgeglichen zu erhalten (King & McLelland, 1975). Bei Meeresvögeln kann durch starke Sekretabsonderung und Ausspülung der salzhaltigen Sekretpartikel der Salzgehalt im Körper erheblich reduziert werden, sie dient hier also als nasale Salzdrüse (Technau, 1936).

Auch bei Gänsen und Greifvögeln ist ein Vorkommen der Nasendrüse belegt (Technau, 1936; Dauborn, 2014). Technau (1936) unterscheidet bei der Nasendrüse dieser Vogelgruppen die primitive Form (bei Arten mit wenig Kontakt zu Wasser), Übergangsformen (bei Vögeln, die sowohl zu Meerwasser als auch Binnengewässern Kontakt haben) und die vollausgebildete Form. Die vollausgebildete Form tritt nur bei Meeres-, Salzsumpf- oder Küstenbewohnern auf, und dabei auch bei Arten, die angeschwemmte Nahrung aufnehmen. Bei Pelikanen (*Pelecanus onocrotalus*) zum Beispiel beschreibt Technau (1936) die Nasendrüse im vordersten Teil des Orbitaldaches (*Os praefrontale*) liegend und, aus der Orbita hinausragend, dem *Os lacrimale* von unten anliegend. Der Drüsenkörper ist bei dieser Vogelart walzenförmig, sich vorn verjüngend und in den einzigen Ausführungsgang auslaufend. Dieser Gang verläuft, der lateralen Nasenhöhlenwand von außen anliegend, in horizontaler Richtung zu dem winzigen, rudimentären Vorhof, in dessen Nähe er mit weitem Lumen nach vorn gerichtet mündet. Vermessungen der Nasendrüse beim Pelikan ergaben eine Länge von 23 mm, eine Breite von 17 mm und eine Höhe von 3 mm (Technau, 1936). Technau (1936) untermauerte die These, dass die Ausprägung der Nasendrüse von der Lebensumgebung abhängig ist, mit der vergleichenden histologischen Untersuchung von Pfuhlschnepfe (*Limosa lapponica*) und Uferschnepfe (*Limosa limosa*), also von stammesgeschichtlich nah verwandten Arten, die sich hauptsächlich in ihrer Lebensweise unterscheiden (Technau, 1936). Beide Arten

brüten im Binnenland, aber beim Vogelzug zeigt die Pfuhlschnepfe eine Vorliebe für die Meeresküste. Bei beiden Arten liegen die Nasendrüsen in schwachen, lateral offenen Supraorbitalgruben. Bei der Pfuhlschnepfe berühren sich die Drüsenkörper bei einer Gesamtlänge von 19 mm in der Mitte der Stirnfläche über eine Länge von 8 mm. Die Drüsen der Uferschnepfe dagegen sind nicht so stark ausgeprägt, dass sie Kontakt aufnehmen könnten. Konkret wurden bei der Messung folgende Werte (Länge : Breite : Höhe in mm) ermittelt: Pfuhlschnepfe 19 : 5 : 1,5, Uferschnepfe 17 : 3 : 0,5 (Technau, 1936). Auch histologisch konnte Technau (1936) Unterschiede darstellen, bei der Pfuhlschnepfe wurden 14 Drüsentuben mit wenig dazwischen liegendem Bindegewebe, bei der Uferschnepfe nur acht Drüsentuben, dafür aber ausgeprägtes Bindegewebe dargestellt.

In der Ordnung Psittaci (heutige Bezeichnung Psittaciformes) wurde von Technau (1936) der von ihm als Zwergara bezeichnete (*Ara severa*) (derzeit auf Deutsch Rotbugara genannt) untersucht. Hier stellte sich die Nasendrüse im vorderen oberen Orbitalwinkel dar. Sie war flach und lappig und hatte zwei Ausführungsgänge, welche durch ein enges Foramen die vordere Orbitalbegrenzung passierten und entlang der äußeren Wand der Nasenhöhle zum Vorhof verliefen. Der mediale Gang mündete dann am Fuß der Schwelle auf dem Vorhofboden der Nasenhöhle, dem *Septum* zugewandt, der laterale Gang endete in der Mitte des unteren wulstigen Randes der Vorhofmuschel. Die genauen Ausmaße der Nasendrüse betrugen 6 mm in der Länge, 2,5 mm in der Breite und 1 mm in der Höhe. Technau (1936) vermerkte, dass es sich bei dem Kongo-Graupapagei (*Psittacus erithacus*), dem Fledermauspapagei (*Loriculus mindorensis*) und dem Buntsittich (*Platycercus eximius*) „ebenso verhält“, es existiert aber keine genauere Beschreibungen und es werden keine Messwerte genannt (Technau, 1936).

King & McLelland (1975) veröffentlichten, dass die Nasendrüse bei den meisten Vögeln aus einem medialen und einem lateralen Lobus mit eigenem Ausführungsgang besteht, bei Haushühnern und anderen eng verwandten Spezies jedoch nur der mediale Lobus präsent ist. Dies bestätigte die Ergebnisse von Technau (1936), der auch noch bei weiteren Arten feststellte, dass nur ein Lobus

mit einem Ausführungsgang angelegt ist, die Drüse somit zusammengesetzt oder einfach tubulös ist.

Bei Pinguinen und Seetauchern ist die Nasendrüse durch die Sekretion einer konzentrierten Salzlösung mit an der Regulierung des Wasserhaushaltes beteiligt. Sie ermöglicht es diesen Vögeln, ihren Wasserbedarf durch Meerwasser zu decken. Die Drüse übersteigt dabei die Leistungsfähigkeit der Nieren und sorgt mit der Abgabe von 10 % NaCl-Lösung für einen Schleimhautschutz gegen Salzablagerungen und Austrocknung (Bateman *et al.*, 1988; Vollmerhaus & Sinowatz, 1992; Eulenberger, 1995; Ball, 2003). Es wurde auch veröffentlicht, dass von in Salzwasserbiotopen lebenden Vögeln („marine birds“) eine 5 % NaCl-Lösung ausgeschieden wird (King & McLelland, 1975). Nitzsch (1820) kam zu dem Schluss, dass die Nasendrüse wohl bei Wasservögeln stärker ausgeprägt, aber wohl auch bei den Landarten vorhanden ist; eine generelle Beziehung zur Wassernähe muss nicht gegeben sein. Dies wurde von Technau (1936) bestätigt und er ergänzte, dass bei Vögeln, die viel Kontakt mit Salzwasser haben, das Volumen der Drüsenkörper größer ist und durch die besser entwickelten Tubuli und eine größere Anzahl von Drüsentuben bedingt ist (Technau, 1936). Eine detaillierte Untersuchung der Nasendrüse der domestizierten Ente erfolgte durch Scothorne (1959). Er wies eine zusammengesetzte tubulöse Drüse nach, die sehr gut vaskularisiert ist. Das produzierte Sekret ist klar, ohne Proteine, wässrig und enthält 3 % Natriumchlorid. Muköse Anteile fehlen der Nasendrüse der Ente (Scothorne, 1959).

Grundsätzlich kann zur Funktion der Nasendrüse gesagt werden, dass sich ihr Sekret über die Flächen des Plattenepithels des Nasenvorhofes verteilt, die besonders dem Respirationsstrom ausgesetzt sind, und dadurch Schutz vor Austrocknung gewährleistet und Fremdkörper ausgeschwemmt werden, die in den Nasenvorhof eingedrungen sind (Technau, 1936). Die Nasendrüse ist eine exokrine Drüse mit merokriner Sekretion, ihr Sekret besteht aus einer kleinen Menge des Zytoplasmas und der Zellmembran der Drüsenzellen. Das Sekret tritt im hinteren Teil des Vorhofes der Nasenhöhle ein, nimmt beim Durchfließen des Nasenvorhofes auf dem Epithel aufliegende Schmutzpartikel und Fremdkörper auf

und transportiert sie durch die äußere Nasenöffnung nach außen (Technau, 1936). Speziell bei gründelnden Arten, bei denen sich eine vermehrte Verschmutzung mit organischen Partikeln in der Nasenhöhle findet, ist diese Reinigungsfunktion von Relevanz (Technau, 1936).

Innerviert wird die Nasendrüse durch den *Ramus temporalis superficialis* des *Nervus facialis* (Cords, 1904). Nach späteren Verlaufsbeschreibungen ist der Nerv vermutlich der *Nervus ethmoidalis*, der ursprünglich aus dem *Nervus ophthalmicus* (V1) bzw. dem *Nervus trigeminus* (V) entspringt (Frewein, 2004). Der *Nervus ethmoidales* tritt nahe dem *Nervus olfactorius* in die Nasenhöhle ein. Er erreicht entlang des *Septum nasi* den Boden der Nasenhöhle und versorgt den Gaumen mit mehreren Ästen und zusätzlich den ganzen Oberschnabel (Frewein, 2004).

2.2 Drüsen des Tränenapparates

Vögel haben eine Nickhaut, *Palpebra tertia seu Membrana nictitans*, ausgebildet, die im Gegensatz zu den Säugetieren allerdings keinen knorpeligen Anteil enthält, sondern zwei Muskeln (*Musculus quadratus membranae nictitantis* und *Musculus pyramidalis membranae nictitantis*), die eine aktive Bewegung ermöglichen. (Schwarze *et al.*, 1972; Seidel, 1988; Kern *et al.*, 1996). Die Hauptaufgabe der Nickhaut ist der Schutz der *Cornea* vor Austrocknung durch die Aufrechterhaltung des Tränenfilms (King & McLelland, 1975; Korb, 2004; Williams, 2012). Ihr soll weiterhin eine wichtige Funktion hinsichtlich der Regulation der Gehirntemperatur durch Steuerung der Verdunstung des präkornealen Tränenfilmes und des bei einigen Arten hinter dem Auge lokalisierten *Rete mirabile* zukommen (Reese *et al.*, 2009).

Der Tränenapparat, *Apparatus lacrimalis*, der Vögel besteht aus drei Drüsen (King & McLelland, 1975; Reese *et al.*, 2009):

Tränendrüse (*Glandula lacrimalis*)

Nickhautdrüse (Hardersche Drüse, *Glandula membranae nictitantis*)

Nasendrüse (*Glandula nasalis*). Sie ist eine umgebildete Tränendrüse und wurde weiter oben bereits beschrieben.

2.2.1 Tränendrüse (*Glandula lacrimalis*)

Die Tränendrüse ist bei Hausgeflügel im temporalen Augenwinkel zwischen Lidbindehaut und *Periorbita* gelegen (Bradley, 1960; Schwarze *et al.*, 1972; Frewein & Sinowatz, 2004; Kern, 2007; Reese *et al.*, 2009; Williams, 2012). Aus dem ventralen Drittel des Drüsenkörpers geht der kurze, dünne und einheitliche Ausführungsgang hervor (Frewein & Sinowatz, 2004). Ihr Ausführungsgang endet im Bindehautsack, *Saccus conjunctivae*, an der Umschlagstelle der *Tunica conjunctiva bulbi* in die *Tunica conjunctiva palpebrarum* des Unterlids und setzt dort das klare, teils alkalische Sekret frei (Bradley, 1960; Schwarze *et al.*, 1972; Frewein & Sinowatz, 2004). Eulenvögeln, bei denen der Tränenapparat nur wenig Tränenflüssigkeit produziert, fehlt die Tränendrüse (Aitken & Survashe, 1977; Reese *et al.*, 2009).

Der Tränenabfluss erfolgt im nasalen Augenwinkel, *Angulus oculi nasalis*, über eine Öffnung (z. B. Pinguine), bei den meisten Vögeln aber über zwei Öffnungen, *Ostia canaliculi lacrimalis* (Reese *et al.*, 2009). Diese *Ostia* liegen auf der Innenseite des oberen und unteren Augenlids, mit deutlichem Abstand zum Lidrand (Reese *et al.*, 2009). Die Tränenkanäle, *Canaliculi lacrimales*, sind nur wenige Millimeter lang und leiten die Tränenflüssigkeit in den Tränennasengang, *Ductus nasolacrimalis*, der in die Nasenhöhle mündet (Reese *et al.*, 2009). Von dort aus gelangt die Tränenflüssigkeit über die Choanenspalte direkt in die Mundhöhle (Reese *et al.*, 2009).

Nummerische Größenbeispiele der *Glandula lacrimalis*: Beim Huhn 8 x 4 x 1 mm, bei der Taube 5 x 2 x 0,3 mm, bei der Ente 5 x 2,5 x 1 mm (Frewein & Sinowatz, 2004). Dabei ist die Tränendrüse der Vögel stets kleiner ausgebildet als ihre *Glandula membranae nictitantis* (Aitken & Survashe, 1977). Der Drüsenkörper ist dunkelrot gefärbt, es handelt sich um eine zusammengesetzte, tubuloazinäre Drüse mit einem Ausführungsgang und einem Lobulityp. Dabei sind die Azini und Tubuli

von einem säulenförmigen Epithel ausgekleidet, das Zytoplasma ist eosinophil und die Zellkerne sind basal lokalisiert (Aitken & Survashe, 1977). In den *Septa*, die den Drüsenkörper durchziehen, und im intralobulären Bindegewebe sind zahlreiche Blutgefäße eingelagert (Aitken & Survashe, 1977). Aitken & Survashe (1977) stellten einen Zusammenhang des Plasmazellvorkommens in der Tränendrüse und in der *Glandula membranae nictitantis* von Vögeln fest. Je mehr Plasmazellen in der Harderschen Drüse nachweisbar waren, desto weniger Plasmazellen konnten sie in der Tränendrüse der Vögel darstellen. Dabei wurden aber nie mehr Plasmazellen in der Tränendrüse als in der *Glandula membranae nictitantis* gefunden (Aitken & Survashe, 1977).

2.2.2 Nickhautdrüse (Hardersche Drüse, *Glandula membranae nictitantis*)

Die Nickhautdrüse, *Glandula palpebrae tertiae* oder *Glandula membranae nictitantis*, gilt als der Hauptproduktionsort der Tränenflüssigkeit beim Vogel und ist meist doppelt so groß ausgebildet wie die Tränendrüse (Reese *et al.*, 2009). Nach ihrer Entdeckung 1964 durch Johann Jacob Harder wird sie auch als „Hardersche Drüse“ bezeichnet (Bradley, 1960; King & McLelland, 1975; Kern *et al.*, 1996; Reese *et al.*, 2009; Liebich, 2010; Williams, 2012), der Begriff ist inzwischen aber veraltet und durch die neuere Nomenklatur *Glandula membranae nictitantis* ersetzt worden, wobei beide als Synonym genutzt werden können. Numerische Größenbeispiele sind beim Huhn 18 x 5 x 1 mm, bei der Taube 8 x 3 x 1,5 mm und bei der Ente 12 x 7,5 x 3,5 mm (Frewein & Sinowatz, 2004). Sie ist im nasalen Augenwinkel lokalisiert, ventrokaudomedial dem Bulbus aufliegend (Slonaker, 1921; King & McLelland, 1975; Korbel, 2000; Kern, 2007; Reese *et al.*, 2009; Liebich, 2010; Williams, 2012). Das Sekret der Nickhautdrüse wird durch einen Ausführungsgang in eine Tasche aus Nickhaut und Sklera geleitet (Seidel, 1988). Die Nickhautdrüse ist eine muköse Drüse (*Glandula mucosa*) (Liebich, 2010). Sie produziert also mukoides Sekret und ist hauptverantwortlich für die Tränenflüssigkeitsproduktion beim Vogel. Sie ist außerdem an der Immunantwort durch die Bildung von Immunglobulin A beteiligt und ein Ansammlungsort von

Lymphozyten und Plasmazellen (Bang & Bang, 1968; Aitken & Survashe, 1977; Seidel, 1988; Burns, 1975, 1992; Reese *et al.*, 2009).

Über die nasal befindlichen, in der Regel doppelt angelegten *Ostia canaliculi lacrimalis*, die Tränenpunkte, fließt die Tränenflüssigkeit ab. Aus den Tränenpunkten erfolgt die Weiterleitung über die Tränenkanäle, *Caniculi lacrimalis*, und den *Ductus nasolacrimalis*, von dort wird die Flüssigkeit in die Nasenhöhle und von dort durch die Choanenspalte in die Schnabelhöhle geleitet (Schwarze *et al.*, 1972; Reese *et al.*, 2009; Williams, 2012).

Die Hardersche Drüse, die, wie bereits erwähnt, ventromedial in der *Orbita* liegt, wird nur wenig an den unterliegenden Muskeln durch periorbitale Faszien fixiert. Der kaudale Fixationspunkt liegt etwas vor dem Ausführungsgang (Burns, 1974; Survashe, 1976). Durch die Lage in der *Orbita* ist die Oberfläche konvex und die laterale Seite konkav und die Drüse folgt der Form des Augapfels an der Auflagefläche. Die umgebende dünne Kapsel teilt die *Glandula membranae nictitantis* in ungleichmäßige Lobuli (Burns, 1974; Survashe, 1976). Dünne kollagene und retikuläre Fasern aus der Kapsel ziehen zwischen die Drüsen- und Sammelgänge. Ein einzelner Ausführungsgang zieht bei Vögeln in den Konjunktivalsack an der Basis der Nickhaut (Burns, 1974; Survashe, 1976).

Histologisch können vier Bereiche unterschieden werden: der Zentralgang der Drüse, der 1. und 2. Sammelgang sowie die Azini. Diese Bereiche unterscheiden sich auch histochemisch (Wight *et al.*, 1971b). Während der Schleim in den Azini und den 2. Sammelgängen hauptsächlich aus mäßig sauren, schwefelhaltigen Substanzen bestand, konnten in den 1. Sammelgängen schwach saure schwefelhaltige und auch neutrale Schleimsubstanzen nachgewiesen werden. In den Azini konnten Hinweise auf Sialinsäure und Hyaluronsäure entdeckt werden (Wight *et al.*, 1971b). Im Tubulusepithel wurden geringe Mengen an Lipiden nachgewiesen, bei denen es sich mehrheitlich um neutrale Fette, wahrscheinlich Triglyceride und Cholesterolester, handelte. In den Azini und dem tubulären Epithel konnte zwar Ribonuklease nachgewiesen werden, Porphyrine wurden aber nicht gefunden. Die Russell-Bodies enthielten eine neutrale Schleimsubstanz und zeigten einen Autofluoreszenz (Wight *et al.*, 1971b).

Von den sekundären Sammelgängen wird das Sekret aus den Azini in die primären Sammelgänge und dann in den Zentralgang geleitet. Die Auskleidung der Gänge wird durch kubische oder säulenartige Zellen gebildet und variiert in der Höhe (Shirama *et al.*, 1996). Die kuboidalen Zellen haben eine luminale Oberfläche und tragen zahlreiche Mikrovilli, sie stellen die markantesten Zellen des Ausführungsganges dar. Die 2. Zelltypen sind polymorph, sie liegen zwischen den kubischen Zellen und tragen an der Oberfläche bürstenförmige Ausstülpungen, welche sich dem Interstitium zuwenden. Die für die 2. Zelltypen verwendete Bezeichnung „Dunkle Zelle“ leitet sich von der Dunkelfärbung von Zytoplasma und Zellkern ab (Olah *et al.*, 1992).

Nach der Art der Epithelzellen, die die Azini und die Tubuli auskleiden, und der Struktur der Drüsenkörperlobuli, werden bei den Vögeln drei verschiedene Typen von Harderschen Drüsen differenziert:

-Typ I: Zusammengesetzte, tubulo-alveoläre Drüsen, deren einzelner Lobus mit einer Art von Epithelialzellen ausgekleidet ist. Im Interstitium der Drüse finden sich mit zunehmendem Alter des Vogels ansteigende Populationen von Plasmazellen. Bsp. Falconiformes, Galliformes, Columbiformes, Psittaciformes

-Typ II: Zusammengesetzte tubuläre Strukturen mit einem Lobus, dieser wird aber von zwei verschiedenen Auskleidungsepithelien ausgekleidet. Im Interstitium der Drüse finden sich viel weniger Plasmazellen, als bei den Typ I Drüsen und die Anzahl der Plasmazellen nimmt im Alter nicht zu. Bsp. Sphenisciformes, Pelicaniformes, Anseriformes

-Typ III: Mix aus Typ I und II, wobei nur in den Lobuli des Typ I Plasmazellen gefunden werden. Bsp. Gruiformes, Piciformes, Passeriformes

(Burns, 1974, 1975, 1992; Survashe & Aitken, 1978)

Laut Burns (1992) hängt der Typ der Harderschen Drüse weniger mit der Lebensumgebung, sondern mehr mit der evolutionären Abstammung der Vögel zusammen.

Myoepitheliale Zellen liegen direkt unter den Epithelzellen der Drüsengänge den interlobulären Trabekeln an, die aus der umgebenden Kapsel hervorgehen. Sie

ziehen von der Basallamina mit ihren zytoplasmatischen Ausdehnungen in langen, dünnen Fortsätzen zwischen die sekretorischen Epithelzellen (Rothwell *et al.*, 1972). Die Plasmamembranen der myoepithelialen Zellen und der darüber liegenden sekretorischen Zellen liegen einander eng an, zwischen den beiden Zelltypen ist nur ein geringer Interzellularraum ausgebildet. Im Elektronenmikroskop kann beobachtet werden, dass sich kleine, villiähnliche Verlängerungen von der oberflächlichen Zytoplasmamembran der myoepithelialen Zellen an unterschiedlichen Orten in der Peripherie des Epithels in den Azini anheften (Shirama *et al.*, 1996). Im ganzen Zytoplasma der Myoepithelzellen kommen feine Fibrillen vor, so wie es auch bei Säugern beschrieben wird. Das Zytoplasma der Zellen wird regelrecht von Myofilamenten beherrscht (Shirama *et al.*, 1996). Die histologische Position der Myoepithelzellen (zwischen und unter den kubischen Zellen der Ausführungsgangepithelien) ist zwar die Gleiche wie bei den Dunklen Zellen, aber ihr Ursprung konnte noch nicht geklärt werden (Shirama *et al.*, 1996). Nach Olah *et al.* (1992) differenzieren sich in der Embryonalentwicklung der Harderschen Drüse die azinären Epithelzellen zu luminalen und basalen Zellschichten. Dabei formen die basalen Zellen eine lose Verbindung im späten Embryo. Diese Zellen ähneln eher Retikuloendothelialzellen von lymphoiden Organen als myoepithelialen Zellen. Aufgrund dieser Beobachtungen nehmen Olah *et al.* (1992) an, dass die embryonale Basalzellschicht in der Lage ist, sich in den Ausführungsgängen zu Dunklen Epithelzellen und um die Azini zu Myoepithelialzellen zu differenzieren.

Del Cacho *et al.* (1991) hat berichtet, dass sich Myoepithelzellen der Harderschen Drüse von Hühnern in Myofibroblasten verwandeln können, wenn ein Antigen auf den Augapfel gegeben wird. Der Ablauf ist wie folgt: Als erstes steht der Verlust der Basallamina im Bereich der angrenzenden Myofibroblasten, dann erscheinen Bündel von Myofilamenten. Später entwickelt sich ein raues Endoplasmatisches Retikulum und ein Golgi Komplex. Dabei zeigen die Myofibroblasten, die von myoepithelialen Zellen abstammen, ultrastrukturelle Eigenschaften sowohl von Fibroblasten als auch von glatten Muskelzellen (Del Cacho *et al.*, 1991). Rothwell *et al.* (1972) bezweifeln jedoch, dass Myofibroblasten physiologischerweise in der Harderschen Drüse vorkommen, weil sie in ultrastrukturellen Studien zur

Histologie der Harderschen Drüse unter physiologischen Umständen noch nie gefunden wurden.

Das interstitielle Bindegewebe der Harderschen Drüse besteht bei Hühnern aus bindegewebigen Septen, die Kapillaren und Nervenfasern enthalten. In den subepithelialen Regionen der Ausführungsgänge und des 1. Sammelganges lassen sich hohe Konzentrationen an lymphatischen Zellen (Plasmazellen und Lymphozyten) finden, bei den untersuchten domestizierten Hühnern stieg die Anzahl dieser Zellen mit dem Alter (Rothwell *et al.*, 1972). Die *Glandula membranae nictitantis* der Vögel wird daher oft als lymphatisches Organ betrachtet, welches verschiedene Arten von Immunglobulinen produziert. In der Drüse von Hühnern konnten von Albini *et al.* (1974) Blasten, unreife Plasmazellen, Plasmazell-ähnliche Zellen und reife Plasmazellen gefunden werden. Dabei erfolgte bis zur 4. Woche nach dem Schlupf der Nachweis von ausschließlich IgM, von der 4. bis zur 9. Woche wurden IgG und IgA nachgewiesen und nach der 9. Woche dominierte IgA (Albini *et al.*, 1974).

Follikuläre dendritische Zellen, die Immunkomplexe binden, sind auch im lymphatischen Gewebe der Harderschen Drüse zu finden. Del Cacho *et al.* (1993) verwendeten ultrastrukturelle und immunhistochemische Methoden um zu zeigen, dass die aviären dendritischen Zellen eine funktionale Aktivierung erleben, die mit morphologischen Veränderungen einhergeht und im Verlauf der Immunantwort eintritt –ähnlich wie bei Säugern.

Die Funktion der *Glandula membranae nictitantis* für das Immunsystem beim Vogel wurde erstmals von Bang & Bang (1968) beschrieben. Sie fanden ungewöhnlich hohe Zahlen von Plasmazellen im Interstitium der Drüse. Hardersche Drüsen des Typs I haben mäßige bis dichte Populationen von Plasmazellen, hauptsächlich im Bereich um den zentralen Ausführungsgang, Typ II Drüsen hingegen beherbergen viel weniger Plasmazellen. Analog findet man in den Typ III Harderschen Drüsen in den tubuloalveolären Anteilen viele Plasmazellen (wie in Typ I) und in den alveolären Anteilen kaum Plasmazellen (wie in Typ II) (Bang & Bang, 1968).

Die Anzahl der Plasmazellen ist abhängig vom Vorhandensein der Bursa Fabricii, wie bei White Leghorn (Kowalski *et al.*, 1978) und New Hampshire Red chickens (Mueller *et al.*, 1971) nachgewiesen wurde, und variiert mit dem Alter (dies wurde nachgewiesen für *Corvus frugilegus* bei Burns, 1975; „broiler chickens“ bei Dohms *et al.*, 1981; *Gallus domesticus* bei Glick, 1978; 86 Vögel, davon acht Psittacidae bei Aitken & Survashe, 1977; Shaver-Weiß bei Wight *et al.*, 1971a). Mueller *et al.* (1971) führten bei Hühnern der Rasse New Hampshire Red eine chemische oder chirurgische Bursektomie durch. Dadurch wurde die Sekretion von Immunglobulinen über die Tränenflüssigkeit und die Anzahl der Plasmazellen in der Harderschen Drüse stark reduziert. Die B-Zellen, die sich in der zweiten Lebenswoche in der *Glandula membranae nictitantis* befinden, differenzieren sich zu Plasmazellen, die dazu fähig sind, Immunglobuline zu produzieren und zu sezernieren. Ein markantes Merkmal von Plasmazellen sind die Russel Körperchen innerhalb des Zytoplasmas (Rothwell *et al.*, 1972). Die Zahl der Russel Körperchen-enhaltenden Plasmazellen der Harderschen Drüsen reduzierte sich bei Hühnern, denen der Thymus entfernt wurde, vergleichbar wie bei bursektomierten Hühnern (Müller *et al.*, 1991).

Für die Zahl der Plasmazellen in der Harderschen Drüse bei Hühnern wurde eine Altersabhängigkeit nachgewiesen. Am dritten Lebenstag lassen sich nur einige wenige Plasmazellen in der Harderschen Drüse finden, doch mit dem fortschreitenden Alter erhöht sich die Zahl rasch. Bei Hühnern im Alter von ca. vier Wochen sind Plasmazellen die vorherrschenden Zelltypen im Interstitium (Shaver-Weiß bei Wight *et al.*, 1971a). Über die dort in größter Zahl gebildeten Immunglobuline herrscht Uneinigkeit. Burns (1977) fand beim „domestic fowl“ nach Augentropfenstimulation mit einem Antigen spezifische IgA und IgG, aber kaum IgM. Davelaar *et al.* (1982) konnten ebenfalls das Vorkommen von spezifischen Antikörpern der Klassen IgA und IgG gegen Infektionen bei Hühnern („parent flock of Hubbard Golden Comet dams with 10 % sires“) nachweisen. Mansikka *et al.* (1989) zeigten mittels In-situ-Hybridisierung, dass alle drei Immunglobulinklassen von den Plasmazellen der Harderschen Drüse in unstimulierten Hühnern (H.B15 Stamm) gebildet werden. Nach lokaler Stimulation

mit Antigen stieg die Produktion von IgA- und IgG- Antikörpern an- jedoch nicht die Produktion von IgM (Mansikka *et al.*, 1989).

Obwohl viele Studien eine wichtige Rolle der *Glandula membranae nictitantis* bei der Immunantwort der drei Immunglobulinklassen stützen, ist nicht sicher, ob die Hardersche Drüse der Sitz der Immunglobulinproduktion ist. Aus Experimenten mit Drüsenzellkulturen folgerten Baba *et al.* (1990), dass IgA der Tränen lokal in der Drüse produziert wird, während IgG und IgM hauptsächlich mit dem Blut in die Drüse transportiert werden.

Die Blutversorgung der Harderschen Drüse der Vögel erfolgt vor allem in der zentralen Region durch fenestrierte Kapillaren, wie sie auch in endokrinen Drüsen bei Säugern beobachtet wurden (Shirama *et al.*, 1996).

Die Sekretion der Harderschen Drüse wird unabhängig vom morphologischen Typ, also bei Typen I, II und III gleichermaßen, als merokrin angesehen (dies wurde nachgewiesen für Shaver-Weiß bei Wight *et al.*, 1971a und Rothwell *et al.*, 1972; weiße Aylesbury Enten bei Fourman & Ballantyne, 1967; Graugans (*Anser anser*), Stockente (*Anas platyrhynchos*), Höckerschwan (*Cygnus olor*) bei Kühnel & Beier, 1973; Saatkrähe (*Corvus frugilegus*) bei Burns, 1975), das heißt, die Ausschleusung des Sekretes (meist Proteine) erfolgt durch Exozytose.

Paule & Hayes (1958) kamen in einer vergleichenden Studie zu dem Ergebnis, dass die Sekrete von 12 Vögeln (1x Anseriformes, 1x Falconiformes, 4x Galliformes, 6x Passeriformes) einen außergewöhnlich einheitlichen mukoiden Charakter aufwiesen. Das Sekret der Harderschen Drüsen von Enten (weiße Aylesbury Enten (*Anas domesticus*)) hat vor allem mukoide Bestandteile, es sind aber auch hohe Anteile von Mukopolysaccharide und Lipide enthalten. Die mukoiden und fettigen Substanzen des Harderschen Drüsensekretes sollen helfen, die Kornea zu schützen und die Beweglichkeit der Nickhaut zu erhalten (Fourman & Ballantyne, 1967).

Ein Vergleich der physiochemischen Zusammensetzung der Muzine von aquatisch und terrestrisch lebenden Vögeln ist bislang nicht erfolgt. Vor allem für die tauchenden aquatisch lebenden Arten ist ein adäquat schützendes Muzin für die

Kornea sehr wichtig. Ein guter abperlender Effekt ist für diese Tiere besonders entscheidend (Shirama *et al.*, 1996).

2.3. Bornaviren und ihre Krankheitsbilder bei Papageienvögeln

2.3.1. Familie *Bornaviridae*

Die Familie *Bornaviridae* gehört zur Ordnung der Mononegavirales. Dabei handelt es sich um behüllte Viren mit einem nichtsegmentierten Einzelstrang-RNA-Genom.

Noch vor einigen Jahren war das Borna Disease Virus (BDV) das einzige bekannte Virus dieser Familie. Der Name wurde dabei von der verursachten Krankheit, der Borna'schen Krankheit (Borna Disease), inspiriert. An dieser erkrankten im Jahr 1895 in der Stadt Borna in Sachsen, Deutschland, fast alle Pferde des Kavallerie-Regiments. Sie zeigten zentralnervöse Störungen, daher stammte auch der ehemalige Name „hitze Kopfkrankheit“ (Stitz *et al.*, 2002), denn diese virale Infektion des zentralen Nervensystems geht mit chronisch progressiver Enzephalomyelitis einher. Zusätzlich treten Verhaltensänderungen wie Stereotypien, Aggression und Erregung auf, gleichzeitig mit unspezifischen Anzeichen wie Apathie und den zentralnervösen Störungen (Sprankel *et al.*, 1978; Rott *et al.*, 1988; Richt *et al.*, 1997; Hallensleben *et al.*, 1998; Algermissen, 2010). Pferde und Schafe sind am häufigsten von der Krankheit betroffen, vereinzelt wurde die Borna Disease aber auch bei anderen Huftieren, Katzen, Hunden und Kaninchen beschrieben (Nakamura *et al.*, 1999; Degiorgis *et al.*, 2000; Jacobsen *et al.*, 2010; Lutz *et al.*, 2015). Vögel werden vom BoDV vermutlich nicht infiziert, einzig ein Fallbericht von 1996 berichtet von Straußen in Israel, die zentralnervöse Störungen zeigten und festlagen. Eine Beteiligung von Bornaviren wurde aber nicht eindeutig nachgewiesen (Ashash *et al.*, 1996).

Von Hilbe *et al.* (2006) wurde die Feldspitzmaus (*Crocidura leucodon*) als natürliches Reservoir für BoDV ausgemacht. Das infektiöse Virus wird von den Tieren über Speichel, Urin und die Flankendrüse ausgeschieden. Andere Wirte, wie

Pferde und Schafe, infizieren sich anschließend intranasal mit den Mammalian Bornaviren und sind als Fehlwirte oder Dead-end-Wirte anzusehen (Nobach *et al.*, 2015). Das heißt, dass die Wirte zwar oft schwer erkranken, selbst aber nicht als bedeutende Infektionsquelle für andere Tiere fungieren, weil sich die Bornaviren nur eingeschränkt vermehren und im Körper ausbreiten.

Seit 2008 wurden dann neue Viren beschrieben und in die Familie *Bornaviridae* eingeordnet. So wurden Bornaviren bei an der PDD erkrankten Papageien isoliert (Honkavuori *et al.*, 2008; Kistler *et al.*, 2008). Zu diesen „aviären Bornaviren“ (ABV, heutige Nomenklatur PaBV) wurden auch die danach entdeckten anderen Stämme und Virusarten zugeordnet, die unterschiedlich stark ausgeprägte Abweichungen vom bisher analysierten Virusgenom aufwiesen. Weissenböck *et al.* (2009b) und Rubbenstroth *et al.* (2013) konnten bei Kanarienvögeln (*Serinus canaria* forma *domestica*), Payne *et al.* (2011a) bei gesunden Kanadagänsen (*Branta canadensis*), Rubbenstroth *et al.* (2012) bei einem Molukkenkakadu (*Cacatua moluccensis*) und Rubbenstroth *et al.* (2014b) bei Prachtfinken (Estrildidae) verschiedene, neue PaBV-Stämme und Virusarten nachweisen. 2012 konnten Fujino *et al.* bei einer Gabunvipere (*Bitis gabonica*) Bornavirussequenzen nachweisen, daher gelten seitdem auch Reptilien als Bornaviruswirte (Fujino *et al.*, 2012).

In in-vitro-Studien konnte durch Rinder *et al.* (2009a), Gray *et al.* (2010) und Zimmermann *et al.* (2014) nachgewiesen werden, dass Zellen von Säugetieren nur bedingt oder gar nicht mit vogelspezifischen Bornaviren infiziert werden können. In den 1990er Jahren und Anfang des neuen Jahrtausends wurden am Robert-Koch-Institut eine Reihe von Studien zum zoonotischen Potential von BDV und einem Zusammenhang von BDV mit psychischen Erkrankungen bei Menschen durchgeführt. Ein solcher Zusammenhang wurde jedoch als unbegründet beurteilt (Hornig *et al.*, 2012; Lutz *et al.*, 2015). Allerdings wurde durch den Nachweis einer BoDV-Infektion im Zusammenhang mit einer Organtransplantation und dem Auftreten einer Enzephalitis (Schlotta *et al.*, 2018) die Diskussion über das zoonotische Potential dieses Virus neu belebt. Als 2015 drei Fälle von verstorbenen Bunthörnchenzüchtern untersucht wurden, die an ZNS-Symptomen verstorben

waren, konnten Hoffmann *et al.* (2015) ein als „variegated squirrel 1 bornavirus“ (VSBV-1) bezeichnetes neues Bornavirus nicht nur in den betroffenen Menschen, sondern auch in einem Bunthörnchen (*Sciurus variegatoides*) nachweisen, das mit einem der Verstorbenen Kontakt hatte.

Nach einer aktuellen Neuklassifizierung (Amarasinghe *et al.*, 2018) werden den *Bornaviridae* zwei Genera zugeordnet. Zum einen das Genus *Carbovirus*, mit der Spezies *Queensland carbovirus* (mit Jungle Carpet Python Virus, JCPV) und der Spezies *Southwest carbovirus* (mit Southwest Carpet Python Virus, SWCPV), welches in Pythonidae (*Morrelia spilota*) nachgewiesen wurde (Amarasinghe *et al.*, 2018). Zum anderen das Genus *Orthobornavirus*, mit insgesamt acht verschiedenen Spezies. Diese lauten, in Anlehnung an die Tiergruppen, in denen sie nachgewiesen wurden und vermutlich dafür auch spezifisch sind: *Elapid 1 orthobornavirus* (mit Loveridge's Garter Snake Virus, LGSV), *Mammalian 1 orthobornavirus* (mit den Viren Borna Disease Virus (BoDV-) 1 und 2), *Mammalian 2 orthobornavirus* (mit Variegated Squirrel Bornavirus 1, VSBV-1), *Psittaciform 1 orthobornavirus* (mit Parrot Bornavirus (PaBV-) 1, 2, 3, 4 und 7), *Psittaciform 2 orthobornavirus* (mit Parrot Bornavirus 5, PaBV-5), *Passeriform 1 orthobornavirus* (mit Canary Bornavirus (CnBV-) 1, 2 und 3), *Passeriform 2 orthobornavirus* (mit Estrildid Finch Bornavirus, EsBV-1) und *Waterbird 1 Bornavirus* (mit Aquatic Bird Bornavirus (ABBV-) 1 und 2) (Amarasinghe *et al.*, 2018).

Unklassifiziert blieben bislang ein als PaBV-6 bezeichnetes Bornavirus und das Gabunviper Bornavirus. In Brasilien konnte bei klinisch an PDD erkrankten Papageien in Sequenzanalysen von Bornavirus-PCR-Produkten noch ein weiteres, sich von anderen *Bornaviridae* abgrenzendes Bornavirus nachgewiesen werden, das von Philadelpho *et al.* (2014) als Parrot Bornavirus 8 bezeichnet wurde.

2.3.2. Bornaviren als Erreger der Neuropathischen Drüsenmagendilatation der Papageien

Das „Macaw wasting syndrome“ bezeichnet eine Krankheit, die erstmals am Ende der 1970er Jahre bei Aras festgestellt wurde (Woerpel & Rosskopf, 1984; Gregory

et al., 1994). Danach wurde festgestellt, dass nicht nur Aras, sondern auch andere Vogelarten befallen werden und seitdem hat sich die Bezeichnung Proventricular Dilatation Disease (PDD, auf Deutsch Neuropathische Drüsenmagendilatation), angelehnt an das Kardinalsymptom, den erweiterten Drüsenmagen, gefestigt. Als chronische Krankheit, für die es keine ätiologische Therapie gibt, ist die PDD ein Krankheitsbild bei Psittaziden, das immer tödlich endet. Die betroffenen Papageien zeigten zunächst unspezifische klinische Symptome wie Apathie und Anorexie. Sie könnten im Kot unverdaute Körner ausscheiden, Durchfall haben, Regurgitieren oder Erbrechen zeigen. Diese gastrointestinalen Symptome führten zu Gewichtsverlust, Dehydratation und zehrten die Vögel aus (Woerpel & Rosskopf, 1984; Graham, 1991; Gregory *et al.*, 1994; Shivaprasad *et al.*, 1995). Oft fiel eine Atrophie der Pektoralismuskulatur auf, dieser Zustand deutete auf einen reduzierten Ernährungszustand hin, obwohl die Papageien eine unveränderte oder sogar vermehrte Futteraufnahme zeigten (Woerpel & Rosskopf, 1984; Gancz *et al.*, 2010). Oft zeigten die erkrankten Vögel zusätzlich eine Polyurie (Ridgway & Gallerstein, 1983). Die Viren könnten auch Schäden im zentralen Nervensystem verursachen, häufig geht dies mit einer Myelitis oder Encephalitis einher. Dadurch wurden neurologische Ausfallerscheinungen wie Zittern und Ataxien, Torticollis und Paraparesen ausgelöst. In schweren Fällen führte die Depression zum Status epilepticus (Woerpel & Rosskopf, 1984; Graham, 1991; Lutz & Wilson, 1991; Gregory *et al.*, 1994; Gancz *et al.*, 2010). Auch Veränderungen am Auge, wie retinale Degenerationen bis zur zentralen Blindheit, eine Neuritis des Sehnerven und ein gehäuftes Auftreten von chronischen, multifokalen Chorioretinitiden der Papageien könnten durch eine Infektion mit Bornaviren verursacht werden (Steinmetz *et al.*, 2008; Korbel & Rinder, 2011; Korbel & Rinder, 2012). Ob auch das Federrupfen, welches bei Vögeln mit Bornavirus-Infektion protokolliert wurde, ätiologisch mit der Virusinfektion zusammenhängt, muss noch bewiesen werden (Horie *et al.*, 2012, Philadelpho *et al.*, 2014). Es gibt verschiedene Krankheitsverläufe. Sowohl perakute und akute Formen als auch Verläufe über Wochen und Monate wurden beschrieben (Phalen, 1986; Gregory *et al.*, 1994; Weissenböck *et al.*, 2009a; Högemann, 2018). Die PDD stellt die häufigste Ursache für Magen-Darm-Erkrankungen bei gehaltenen Großpapageienarten, wie z. B. Aras

und Graupapageien, dar. Sie war in einer Studie mit 1640 einbezogenen Vögeln verantwortlich für 60 % bis 70 % der veränderten Befunde an *Proventriculus* und *Ventriculus* (Reavill & Schmidt, 2007). Bei den Kakadus dieser Studie war die durch PDD ausgelöste Ganglioneuritis und Leiomyositis die vierthäufigste Veränderung. Bei Aras und Graupapageien war PDD sogar die häufigste Erkrankung (174 von 285 Aras, 115 von 166 Graupapageien). Zusätzlich zur Ganglioneuritis wurden hauptsächlich Peritonitiden, eine Mineralisation der Drüsen des *Proventriculus* und Ventrikulitiden nachgewiesen (Reavill & Schmidt, 2007). Die lymphoplasmazytären inflammatorischen Infiltrate im Nervensystem wurden von einer klassischen Ganglioneuritis und Leiomyositis im Magen-Darm-Trakt begleitet. Bei Amazonen traten diese Befunde seltener auf, hier konnte die Ganglioneuritis als PDD Befund nur bei vier von 72 untersuchten Vögeln nachgewiesen werden (Reavill & Schmidt, 2007).

Aviäre Bornaviren sind mittlerweile als Erreger der PDD akzeptiert. In zahlreichen Untersuchungen, sowohl an natürlich mit Bornaviren infizierten Papageien als auch in Infektionsversuchen wurde der kausale Zusammenhang der aviären Bornaviren mit PDD nachgewiesen (De Kloet & Dorrestein, 2009; Lierz *et al.*, 2009; Rinder *et al.*, 2009b; Kistler *et al.*, 2010; Raghav *et al.*, 2010; Villanueva *et al.*, 2010, Mirhosseini *et al.*, 2011; Payne *et al.*, 2011b; Piepenbring *et al.*, 2012, 2016). In den Infektionsversuchen, die größtenteils an Nymphensittichen (*Nymphicus hollandicus*) durchgeführt wurden, und mit PaBV-2 oder PaBV-4 als Infektionsvirus, wurde das Krankheitsbild der PDD erzeugt (Kistler *et al.*, 2008; Gancz *et al.*, 2009b; Gray *et al.*, 2010, Mirhosseini *et al.*, 2011; Piepenbring *et al.*, 2012, 2016; Rubbenstroth *et al.*, 2014a; Högemann, 2018; Leal de Araujo *et al.*, 2017).

Eine weltweite Verbreitung des Krankheitsbildes ist anzunehmen, der Nachweis erfolgte bislang in Europa (Gerlach, 1986; Mannl *et al.*, 1987; Rinder *et al.*, 2009a), den USA (Ridgway & Gallerstein, 1983; Woerpel & Rosskopf, 1984), Australien (Doneley *et al.*, 2007; Weissenböck *et al.*, 2009a), Brasilien (Philadelpho *et al.*, 2014), Israel (Lublin *et al.*, 2006), Japan (Ogawa *et al.*, 2011) und Südafrika (Last *et al.*, 2012).

2.3.3. Gewebetropismus der Bornaviren und experimentell verfolgte Ausbreitung im Körper

Bei Vögeln tritt ein breiter Gewebetropismus der Viren auf, anders als bei den BoDV-Infektionen der Schafe und Pferde, bei diesen Tierarten zeigte das Virus hauptsächlich Neurotropismus (Ouyang *et al.*, 2009; Rinder *et al.*, 2009a; Weissenböck *et al.*, 2009a; Kistler *et al.*, 2010; Löffler, 2011). Für die Papageien-Bornaviren wurde zunächst vermutet, dass eine Infektionsübertragung auf dem fäkal-oralen Weg stattfindet, da Virus im Kot nachgewiesen wurde (Rinder *et al.*, 2009a; Hoppes *et al.*, 2010). Löffler (2011) konnte mit immunhistochemischen Untersuchungen und real-time-PCR auch den Befall von zahlreichen weiteren Organen nachweisen. Neben dem Verdauungstraktabschnitt vom Kropf bis ins Duodenum und dem Nervengewebe (Groß- und Kleinhirn), konnten hier auch in Haut- und Federn, Muskeln, Gonaden, Herz und Gefäßwänden, Nieren und Nebennieren, Lunge, Leber, Milz und Pankreas teilweise hohe Virusansammlungen nachgewiesen werden. Somit kommen jegliche Ausscheidungsprodukte und auch Federstaub als Infektionsmaterial in Frage (Löffler, 2011).

In Infektionsversuchen gelang es nicht mittels peroraler und nasaler Bornavirusapplikation eine Infektion zu erzeugen (Korbel *et al.*, 2011; Heckmann *et al.*, 2017), der genaue Infektionsweg ist derzeit noch unbekannt.

Die ersten Versuche, die an nachgewiesenen Bornavirus-Infektion-freien Nymphensittichen erfolgten, infizierten ihre Nymphensittiche intracerebral oder intravenös mit PaBV-4. Es folgten über 33 Wochen regelmäßig klinische, molekularbiologische und histologische Untersuchungen der Vögel. Die ersten Antikörper konnten sieben Tage nach der Infektion nachgewiesen werden, der erste RNA-Nachweis erfolgte nach 19 Tagen (Piepenbring *et al.*, 2012). Die Folgestudie von 2016, bei der ein PaBV-2-Isolat injiziert wurde, konnte nach sechs Tagen die ersten Antikörper detektieren, Virus-RNA diesmal erstmals 27 Tage nach der Infektion. Allerdings wurde in dieser Studie ein schwererer Krankheitsverlauf bei den Nymphensittichen dokumentiert (Piepenbring *et al.*, 2016). Um die natürliche Infektionsroute nachzustellen, wurden Nymphensittiche p. o. und nasal mit PaBV-4 infiziert (Heckmann *et al.*, 2017). In den folgenden sechs Monaten konnten keine

klinischen Symptome, keine Virus-RNA, Antikörper gegen Bornaviren oder pathohistologische Befunde nachgewiesen werden. Es ist allerdings fraglich, ob andere Faktoren eine erfolgreiche Infektion der Nymphensittiche unterbunden haben (Heckmann *et al.*, 2017). Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den Ergebnissen von Morales *et al.* (1988) an Ratten. Er infizierte neonatale Ratten intranasal mit BDV (Giessen strain He/80, isoliert aus Pferdegehirn), diese Jungtiere infizierten erfolgreich ihre Mütter.

Eine neue Studie geht nach ihren Ergebnissen an experimentell infizierten Nymphensittichen (*Nymphicus hollandicus*) davon aus, dass die Verbreitung des Bornavirus im Körper ähnlich dem Tollwut-Virus über retrograden axonalen Transport erfolgt (Leal de Araujo *et al.*, 2017). Dabei wurde der Ausbreitungsweg von PaBV-2 in Nymphensittichen vom Tag der experimentellen Infektion bis zum Tag 114 nach der Infektion durch pathologische, histologische und Untersuchungen mit der RT-PCR dargestellt. Dabei ergab sich, dass das Virus von der Injektionsstelle am *Musculus pectoralis* über die Interkostalnerven und das Rückenmark zunächst ins Gehirn wanderte und sich danach von dort aus über das zentrale Nervensystem in die organbegleitenden Ganglien ausbreitete (Leal de Araujo *et al.*, 2017). Erst ab Tag 40 bzw. 60 p. i. konnten erste befallene Zellen in Epikard und Pankreas festgestellt werden. Ab Tag 80 p. i. war auch die glatte Muskulatur von Magen-Darm-Trakt und Gefäßen sowie die Haut befallen. Federn fielen erst ab Tag 100 p. i. positiv auf (Leal de Araujo *et al.*, 2017). Ein Befall von Zunge, Trachea, Lunge, Kopfhöhlen, Syrinx, Schilddrüse, Nebenschilddrüse, Tibiotarsus und Thymus konnte zu keiner Zeit festgestellt werden. Der Befall der Milz zeigte sich ausschließlich in den Gefäßwänden. In der Leber war in der Untersuchungszeit kein Nachweis von Bornaviren möglich (Leal de Araujo *et al.*, 2017). Dies steht im Gegensatz zu Untersuchungsergebnissen bei natürlich infizierten Vögeln, bei denen Bornavirus-Antigen mittels IHC in der Leber nachgewiesen wurde (Rinder *et al.*, 2009a; Löffler, 2011)

Tizard *et al.* (2016) konnten in ihrer Studie nicht sicher beurteilen, ob sich die festgestellte nichteitrige Entzündung von Gehirn und Nervensystem vom Gehirn über die Gehirnnerven und dann ins Rückenmark zentrifugal im Körper ausbreitet,

oder ob die Infektion entgegengesetzt verläuft. Nach Auffassung von Steinmetz *et al.* (2008) und Tizard *et al.* (2016) spielen der *Nervus vagus* und der *Nervus opticus* wichtige Rollen bei der Ausbreitung des Virus im Körper, vor allem im Zusammenhang mit der einsetzenden Blindheit und der Dilatation des Drüsenmagens. Lähmungen und Ataxien deuten auf eine Ausbreitung über das Rückenmark hin (Tizard *et al.*, 2016).

2.3.4. Pathologie und Histologie

Schon vor der Identifizierung der Bornaviren als Erreger der PDD wurden charakteristische pathologische und histologische Veränderungen dieser Erkrankung dokumentiert. Woerpel & Roskopf (1984) beobachteten die typische Erweiterung des Drüsenmagens bei gleichzeitiger Wandverdünnung, ausgelöst durch die Anschoppung von Ingesta durch einen herabgesetzten Muskeltonus (Clark, 1984), sowie lymphoplasmazelluläre Infiltrationen in den myenterischen Ganglien und Nerven von Kropf, Drüsen- und Muskelmagen. Ulzerationen der Drüsenmagenwand können zu Rupturen und damit zu Peritonitiden führen (Gancz *et al.*, 2010), gleichzeitig kann durch die räumliche Ausdehnung und den steigenden Druck auf die anderen Organe eine Atrophie dieser Organe entstehen (Clark, 1984). Gancz *et al.* (2010) berichteten, dass sich unabhängig von den klinisch auftretenden Symptomen Läsionen meist im Magen-Darm-Trakt und im zentralen Nervensystem finden lassen, aber am häufigsten mit fast 90 % in der Nebenniere. Unterschiedlich stark ausgeprägte Infiltrationen von Lymphozyten, teilweise begleitet von wenigen Plasmazellen, wurden häufig in der Umgebung der Nerven der Organe beschrieben, in den Nervensystemen wurde perivaskuläres Cuffing dokumentiert (Gancz *et al.*, 2010). Wünschmann *et al.* (2011) fanden feine lymphoplasmatische Ganglionitiden von Kropf, Drüsenmagen und/oder Muskelmagen. Doch dies war nicht bei allen Vögeln mit Drüsenmagendilatation darstellbar. Bei den drei Vögeln, bei denen Rückenmark und Spinalganglien untersucht werden konnten, fanden sich gering- bis mittelgradige lymphoplasmatische Spinalganglionitiden und Myelinitiden (Wünschmann *et al.*, 2011). Ein Vogel hatte eine lymphoplasmatische

Endokarditis. Die beiden untersuchten Nebennieren zeigten eine lymphoplasmatische Adrenalitis. Bei drei Vögeln gab es keine Hinweise auf eine lymphoplasmatische Ganglionitis und Encephalitis (Wünschmann *et al.*, 2011). Leal de Araujo *et al.* (2017) untersuchten Nymphensittiche (*Nymphicus hollandicus*) nach experimenteller Infektion. Dabei wurde nach fünf Tagen histologisch eine Entzündung im Injektionsmuskel durch Nachweis von Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen belegt, nach 20 Tagen fand sich im Bronchial-Plexus eine gering ausgeprägte lymphoplasmazytäre Neuritis. Nach 25 Tagen zeigten alle untersuchten Vögel im Rückenmark und Gehirn (graue Substanz und Meningen) eine Encephalitis und Myelitis. Nach 30 Tagen hatten sich die Viren in die Ganglien, den Sehnerv und den Ischias-Nerv ausgebreitet. 40 Tage nach der Infektion erfolgte der Nachweis in Nieren, den Epikard-Ganglien und Nerven im Kloakalbereich, final wurde nach 80 Tagen eine lymphoplasmatische dermale Neuritis, hauptsächlich am Flügel, diagnostiziert. Rinder *et al.* (2009a) und Raghav *et al.* (2010) konnten zeigen, dass die Viren nicht zytopathogen sind und die Infektion einer Zelle mit Bornaviren nicht zwangsläufig auch mit pathologischen Veränderungen einhergehen muss. Histologische Studien zu Bornavirus-Infektionen liegen also derzeit für eine ganze Reihe von Organen und Geweben vor, histologische Untersuchungen des respiratorischen oder olfaktorischen Epithels des Kopfes der Papageien und der damit assoziierten Drüsen liegen allerdings noch nicht vor.

Für die immunhistochemischen Untersuchungen werden Antiseren mit Antikörpern verwendet, die an Bornavirus-Nukleoprotein (N-Protein) binden. Damit konnten Ouyang *et al.* (2009) bei PDD-verdächtigen Vögeln im Gehirn Zellen markieren, in denen Bornavirus-N-Protein enthalten war. Doch das Vorkommen von PaBV beschränkte sich nicht nur auf das Nervensystem, sondern es erfolgte in zahlreichen Organen ein Virusproteinnachweis (Rinder *et al.*, 2009a; Raghav *et al.*, 2010; Löffler, 2011; Wünschmann *et al.*, 2011). Löffler (2011) konnte in Gehirn, Rückenmark, Herz, Gastrointestinaltrakt, Leber, Pankreas, Urogenitaltrakt, Auge, Sehnerv und Gefäßwänden Bornavirus-N-Protein nachweisen. Wenn Tiere mit einer besonders ausgeprägten PDD-Symptomatik auffallen, könnte davon ausgegangen werden, dass sich das Virus bereits auf mehrere Organsysteme

ausgebreitet hat, während bei klinisch unauffälligen Tieren eventuell hauptsächlich das neuronale Gewebe befallen sein könnte (Lierz *et al.*, 2009; Kistler *et al.*, 2010). Wünschmann *et al.* (2011) dagegen konnten bei Vögeln mit klinischen Anzeichen für PDD das PaBV-Antigen hauptsächlich in den neuroektodermalen Zellen wie Neuronen, Astroglia, Ependymzellen des ZNS, Neuronen des PNS und Zellen der Nebennieren nachweisen. Dabei war Antigen sowohl in Zellkernen als auch im Zytoplasma nachweisbar. Bei zwei klinisch unauffälligen Vögeln konnte PaBV-Antigen dagegen weiter verteilt zusätzlich auch im Zytoplasma und Zellkernen der Epithelzellen des Magen-Darm- und Urogenitaltraktes, Retina, Herz, Skelettmuskeln und der Haut nachgewiesen werden (Wünschmann *et al.*, 2011). Immunhistologische Untersuchungen zum Nachweis von Bornavirus-Antigen im respiratorischen und olfaktorischen Epithel des Kopfes der Papageien oder in den damit assoziierten Drüsen liegen allerdings noch nicht vor.

2.3.5. Nachweismethoden der Papageien-Bornaviren

Bevor Bornaviren als Krankheitserreger der PDD bekannt waren, basierte die Diagnose der PDD auf den vorhandenen klinischen Symptomen oder pathologischen Veränderungen, die bei den Papageien festgestellt wurden (Bond *et al.*, 1993; Gregory *et al.*, 1994) und daran anschließenden Untersuchungen mit Nachweis lymphoplasmazytärer Infiltrate und einer Degeneration von Ganglien in der Biopsie aus der Wand des Magen-Darm-Traktes (Bond *et al.*, 1993). Die charakteristische Histologie galt dabei als Goldstandard für die Diagnose. Probleme ergaben sich durch die niedrige Sensitivität der Histologie von Biopaten beim lebenden Vogel (Bond *et al.*, 1993). Eine verlängerte Passagezeit von verabreichtem Kontrastmittel sowie Lage- und Volumenveränderungen des Magen-Darm-Traktes waren ebenso Hinweise auf PDD (Bond *et al.*, 1993). Seit Bornaviren als Erreger allgemein anerkannt sind, hat sich beim Vorliegen einer entsprechenden Infektion, bedingt durch die klinische Symptomatik der Papageienvögel, die Virusdetektion mit direktem oder indirektem Nachweis als Bestätigung der Diagnose etabliert.

Tests zum Nachweis von PaBV werden natürlich auch zum Ausschluss einer Infektion durchgeführt, also um eine Virusfreiheit zu bestätigen.

2.3.5.1. Virusgenom-Nachweisverfahren

Der Nachweis von Virusgenom erfolgt bei pathologischen Untersuchungen toter Vögel aus Organproben oder bei lebenden Tieren aus Abstrichtupferproben, seltener aus Federkielen oder Kotproben, mittels molekularbiologischen Methoden. Schon bei der Erstbeschreibung der Papageien-Bornaviren im Jahr 2008 (Honkavouri *et al.*, 2008; Kistler *et al.*, 2008) wurden reverse Transkriptase-PCR- und Realtime-reverse Transkriptase-PCR-Protokolle beschrieben (je nach Protokoll auf verschiedene Zielgene ausgerichtet), die auch heute noch häufig angewendet werden.

Von lebenden Tieren werden die Abstrichtupfer bevorzugt von Choane, Kropf oder Kloake entnommen. Bei Tupferproben von lebenden Vögeln sind die PCR-Methoden aber manchmal nicht sensitiv genug. Bei auf diese Weise negativ getesteten Tieren war nämlich teilweise *post mortem* in Organgewebe Bornavirus-RNA nachweisbar (Lierz *et al.*, 2009; Rinder *et al.*, 2010b). Eine weitere Schwierigkeit für PCR-Verfahren stellt die genetische Diversität der Bornaviren dar. Mutationen in der Primer- oder Sondenregion können einen falsch negativen Befund liefern (Rubbenstroth *et al.*, 2012).

2.3.5.2. Antikörper-Nachweisverfahren

Heute werden in der Regel auch serologische Verfahren zum Antikörpernachweis bei Papageienvögeln eingesetzt, um Infektionen nachzuweisen. Mit ELISA und Immunfluoreszenztechniken können hoch sensitiv Bornavirus-Infektionen häufig auch dann erkannt werden, wenn die Virusausscheidung über den Gastrointestinaltrakt zu gering für einen Virusgenom-Nachweis ist. Bei 39 Tieren eines Bestandes konnten Rinder *et al.* (2010a) bei 16 Individuen bei Verwendung

eines ELISA mit rekombinantem N-Protein als Antigen Anti-Bornavirus-Antikörper nachweisen, aber nur bei sechs Vögeln lieferte die PCR ein positives Ergebnis und nur ein Tier zeigte klinische Symptome. Während die RT-PCR kein Ergebnis lieferte, konnten De Kloet *et al.* (2011) bei einigen Vögeln Anti-Bornavirus Nukleoprotein-Antikörper finden. Herzog *et al.* (2010) etablierten den indirekten Immunofluoreszenz Assay (IIFA) zum Nachweis Bornavirus-spezifischer Serumantikörper. Er gründet sich auf der Kreuzreaktion von anti-PaBV-Antikörpern mit BoDV-Antigenen (Madin-Darby Canine Kidney-Zellen, persistent infiziert mit BoDV, H1766, Pferde-Stamm). Bei begleitenden Versuchen mit der Wachtel Zelllinie CEC-32 (Zöller *et al.*, 2000), die persistent mit PaBV infiziert war, und den Seren von sechs an PDD erkrankten Papageienvögeln, ließen sich vergleichbar gute Ergebnisse erzielen, daher wurde eine mit einem IIFA mit PaBV-Antigen vergleichbare Sensitivität gefolgert (Herzog *et al.*, 2010). Allerdings wurde in einer anderen Studie gezeigt, dass die Sensitivität der IIFA je nach verwendetem Antigen variierte. Bei im Bezug auf das Infektionsvirus homologem Antigen war die Sensitivität am höchsten, und mit der Verwendung von PaBV als Antigen konnte für den Nachweis von anti-PaBV-Antikörpern bei Papageien eine bessere Sensitivität erreicht werden, als bei Verwendung von BoDV als Antigen (Zimmermann *et al.*, 2014).

Auch der Western-Blot wurde als serologisches Nachweisverfahren getestet (De Kloet & Dorrestein, 2009; Lierz *et al.*, 2009, Rinder *et al.*, 2010b), jedoch ist die Technik weniger sensitiv als der ELISA und zudem teurer und sehr arbeitsintensiv (Hoppes *et al.*, 2010; Rinder, persönliche Mitteilung). Antikörpertests können ein breiteres genetisches Spektrum an Bornaviren erkennen und anzeigen, hier liegt ein Vorteil gegenüber der PCR (Rubbenstroth *et al.*, 2012).

2.3.5.3. Antigen-Nachweisverfahren

In der Histologie gibt es zum Nachweis von Bornavirusproteinen in der Immunhistochemie (IHC) die unterschiedlichsten Färbeprotokolle. Dabei unterscheiden sich zunächst die untersuchten Gewebe, die Fixationsmedien, die

maximalen Temperaturen, denen die Schnitte ausgesetzt wurden, die Puffermedien und die verwendeten Antikörper. Ein Vergleich gestaltet sich schwierig, weil in den jeweiligen Untersuchungen nur eine Methode verwendet wurde und zudem verschiedene Tierarten untersucht wurden. Zusätzlich gibt es die unterschiedlichsten Einwirkzeiten der einzelnen Schritte und andere verwendete Reagenzien.

Von Weissenböck *et al.* (2009b) wurde ein Kanarienvogel untersucht. Dabei wurde ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper auf das rekombinante Phosphoprotein BoDV eingesetzt, welcher Kreuzreaktionen mit PaBV gezeigt hatte (von W. I. Lipkin, University of California, Irvine). In dieser Studie konnte in zahlreichen Zellen des Gehirns Antigen nachgewiesen werden, vor allem in den Bereichen, die pathohistologische Veränderungen aufwiesen. Dabei waren vor allem Neuronen und Astrozyten betroffen, in stark positiven Bereichen konnte auch im Neuropil ein Bornavirus-Antigennachweis erfolgen. Nervenfasern und vegetative Nervenplexus aus Drüsen- und Muskelmagen erbrachten positive Befunde, ebenso wie Hepatozyten und Gallengangsepithelzellen der Leber, Nierentubulusepithelzellen der Niere und Bronchialepithelzellen der Lunge (Weissenböck *et al.*, 2009b).

Von Weissenböck *et al.* (2009a) wurden auch 20 Psittazidenspezies untersucht, es wurden hauptsächlich Gewebeproben des Gehirns, aber auch andere Nerven, einbezogen. Dabei wurden drei verschiedene Antikörper verwendet: Zwei monoklonale (Anti-N-Protein von BoDV, Bo18 hergestellt von S. Herzog, 38/17C1 hergestellt von L. Stitz) und der polyklonale Antikörper gegen das Phosphoprotein von BoDV von W. I. Lipkin, der auch bei der Untersuchung des Kanarienvogels eingesetzt worden war (Weissenböck *et al.*, 2009b). Die Schnitte wurden in einer Mikrowelle in Citratpuffer gekocht, im Färbeprotokoll wurde PBS als Puffer verwendet. Auf diese Weise konnte nur mit dem polyklonalen BoDV-Antikörper, und zwar vor allem in der grauen Substanz, weniger häufig in der weißen Substanz, aber jeweils in allen vorkommenden Zelltypen (Purkinjezellen, Astrozyten, Neuronen) ein Nachweis von Antigen erfolgen. Dabei wurden positives Zytoplasma und positive Zellkerne nachgewiesen, sowohl in Zellen gleichzeitig als auch singulär. In Kropf, Drüsenmagen, Muskelmagen, intramuralen und subserösen

Nervenplexi und Ganglien, Dünndarm, Herz und Lunge konnte jeweils in den Nervenfasern und Ganglien ein positiver Antigennachweis erfolgen. Vereinzelt waren glatte Muskelzellen stark positiv. In Leber, Niere und Haut konnte kein Antigen nachgewiesen werden. Insgesamt konnte in dieser Studie kein Zusammenhang zwischen dem Nachweis von Virus-Antigen in einer Zelle und einer Entzündungsreaktion erbracht werden (Weissenböck *et al.*, 2009a).

In einer Studie von Rinder *et al.* (2009a) wurden zwei Tiere (Blaukronenamazone, *Amazona ventralis*, PaBV-2; Gelbbrustara, *Ara ararauna*, PaBV-4) immunhistochemisch untersucht. Es wurde Formalin zur Fixation verwendet und Triton X-100 zur Permeabilisierung des Gewebes. Zusätzlich kam Kaninchen-Antiserum, erzeugt gegen BoDV-P-Protein, in Blocking-Lösung (PBS mit 5 % Ziegen-Serum) und PBS als Puffer zum Einsatz. Die an PaBV-Antigen bindenden Antikörper wurden durch die Verwendung von biotinylierten Ziegen-anti-Kaninchen-Antikörpern und ABC-Lösung visualisiert. Die Durchführung der IHC erfolgte bei Raumtemperatur. Dabei konnte in zahlreichen Zellen des Gehirns PaBV-Antigen nachgewiesen werden. Zusätzlich ergaben die Villi des Intestinums positive Befunde, ebenso wie die Epithelialzellen und Zellen der *Lamina propria* des Intestinums. Bei der Untersuchung des Herzens wurden die Myozyten positiv angefärbt. Auch in der Leber konnte ein großes Areal mit positiv angefärbten Zellen dargestellt werden, aufgrund der Lokalisation wurden infizierte Neuronen vermutet (Rinder *et al.*, 2009a).

Löffler (2011) hat acht Papageien untersucht. Die Organproben wurden in Zamboni-Medium fixiert, als Antikörper wurde ein polyklonaler Anti- PaBV-N-Protein-Antikörper aus einem Kaninchen verwendet. Das rekombinante Protein, welches zur Immunisierung verwendet worden war, wurde als Histidin-markiertes PaBV-N-Protein in *E.coli* exprimiert und aufgereinigt (Reuter *et al.*, 2010). Die Höchsttemperatur der Schnitte betrug 80 °C im Ofen zur Paraffinschmelzung. Bei zwei Vögeln dieser Studie wurden lymphoplasmazytäre Infiltrate in Ganglien und Nerven der Wand des proximalen Intestinaltraktes darstellen, bei einem anderen Vogel nur mononukleäre Infiltrate (die ohne Verbindung mit entsprechenden Ganglien oder Nerven lediglich als diagnostisch für eine allgemeine Virusinfektion

gelten), es lagen bei diesen drei Vögeln also klassische Entzündungsbefunde vor. Bei drei Vögeln wurden Gliazellproliferationen nachgewiesen. PaBV-N-Protein wurde mittels IHC in unterschiedlichen Zellen des ZNS, in Enterozyten des Magen-Darmtraktes, in den Nieren und in Epithelien der harnableitenden Wege, in den Gonaden, den Augen und den Hautepithelzellen nachgewiesen. Bei zwei weiteren Vögeln waren die Zellen in geringerem Ausmaß betroffen, bei weiteren zwei Tieren konnte nur im Gehirn PaBV-N-Protein detektiert werden (Löffler, 2011).

Wünschmann *et al.* (2011) untersuchten 15 Psittaziden. Sie verwendeten für die Immunhistochemie ein polyklonales Antiserum gegen das N-Protein von PaBV-3 (Stamm 1367; GenBank accession no. FJ169440). Nach Entparaffinierung und Rehydrierung wurden die Schnitte für 15 Minuten in 3 % H₂O₂ inkubiert. Als Spüllösung wurde mit Tris gepufferte Kochsalzlösung mit 0.05 % Tween 20[®] (TBST 0.05 M, pH 7.6) verwendet. Die Inkubation mit dem Anti- PaBV Antiserum erfolgte bei Raumtemperatur, ebenso der Sekundärantikörper (polymermarkierter Ziegen Anti-Kaninchen Immunoglobulin G; mit 2% Normal-Huhn-Serum). Die Visualisierung erfolgte mittels 3-Amino-9-Ethylcarbazole (AEC). In der Studie konnte im Hirnstamm und Großhirn Bornavirus-Antigen dargestellt werden. Dabei war vor allem die graue Substanz betroffen, mit Neuronen, Astrogliazellen (vor allem angrenzend an Kapillaren) und Ependymzellen, in der weißen Substanz hauptsächlich die Gliazellen. Das Kleinhirn war im Vergleich weniger stark infiziert, hier waren weniger die Purkinjezellen, dafür häufiger die Bergmann-Gliazellen positiv angefärbt. Des Weiteren wurden PaBV Antigen-positive Neuronen und Gliazellen im Rückenmark, den Spinalganglien und in den Ganglien des Myenterischen Plexus in Kropf, Drüsenmagen, Muskelmagen und Duodenum gefunden. Bei den positiven Neuronen war eine starke Anfärbung des Zellkerns, bei weniger starker Anfärbung des Zytoplasmas zu beobachten. Eine alleinige Anfärbung des Zytoplasmas wurde in den Inselzellen des Pankreas beobachtet. Es konnte auch in der *Lamina muscularis* von Kropf und Drüsenmagen in den glatten Muskelzellen, in den glatten Muskelzellen von Arterien im Magen-Darm-Trakt und dem Herzen, sowie Axonen und Zellkernen von Schwann-Zellen der unmyelinisierten viszerale Nerven bei einzelnen Tieren Antigen dargestellt werden. Bei einzelnen Tieren konnte ebenfalls in Kardiomyozyten,

Tubularepithelzellen der Niere, Epithelialzellen des Drüsenmagens, Epithelialzellen des Duodenums, die Retina und Zellen der Nebenniere positive Nachweise erbracht werden (Wünschmann *et al.*, 2011).

Brüggemann (2012) untersuchte in ihrer Dissertation immunhistochemisch mehrere Organe von drei Wachteln. Die Gewebeproben wurden in Zamboni-Medium fixiert, der Puffer war PBS, ein polyklonaler Antikörper aus Kaninchen (wie bereits bei Löffler (2011) beschrieben) wurde zur Detektion von rekombinantem PaBV-N-Protein verwendet. Es konnten in dieser Studie allerdings keine Nachweise für eine erfolgreiche Infektion dargestellt werden, weder in der Histologie und der Immunhistochemie oder molekulargenetisch mittels PCR noch mit ELISA.

Krautz (2015) beschäftigte sich mit BoDV und untersuchte Gehirne von Lewis Ratten zur Untersuchung der altersbedingten Veränderungen bei Purkinjezellen, Oligodendrozyten, Astrozyten und Mikroglia, im Laufe einer persistenten BoDV-Infektion. Sie verwendete als Fixationsmedium 4 %ige Formaldehyd-Lösung, die Proben wurden nur bei Zimmertemperatur behandelt, TBST-20X (mit Tris gepufferte Kochsalzlösung mit Tween 20^g, Tween-Waschpuffer) als Puffer, der verwendete Antikörper war gegen BoDV-Nukleoprotein p38 (Maus-Anti-BVD p38/40 protein 38/17C1) gerichtet. Die meisten positiven Befunde erhielt sie ab den Wochen 4 bis 6 p. i. im Ammonshorn und *Gyrus dentatus* (64 %) sowie in der Purkinjezellschicht (52 %) (Krautz, 2015).

Leal de Araujo *et al.* (2017) untersuchten zahlreiche Organe von Nymphensittichen (*Nymphicus hollandicus*). Sie verwendeten als Fixationsmedium Formalin 10 %, kochten die Schnitte einmal bei 121 °C für 20 Minuten im handelsüblichen EMS Puffer C der Firma EMS (Electron microscopy sciences, Hatfield, PA), und es wurde ein polyklonaler Kaninchen Anti-PaBV-N-Primärantikörper verwendet. In der Immunhistochemie konnte die Injektionsstelle bis zum 100. Tag nach der Infektion immer positiv angefärbt werden. Ab dem 20. Tag konnte in den Schwann-Zellen des Brachial-Plexus und im ventralen Horn des thorakalen Segments des Rückenmarks Antigen detektiert werden. Ab dem 25. Tag war die Ausbreitung ins cervicale und lumbale Rückenmark darstellbar, ebenso im Gehirn, den ingluvial

und intestinal Ganglien und Zellen des Nebennierenmarks. Ab dem 35. Tag wurde in diversen Organen wie Drüsenmagen, Muskelmagen, dem *Nervus vagus*, Augen, Oesophagus, Epikard, Nieren- und Kloakalganglien sowie den Langerhanszellen des Pankreas ebenfalls Anti-PaBV-N angefärbt. Vom 80. bis zum 114. Tag nach der Infektion ließ sich dann auch in Haut, glatten Muskelzellen des Magen-Darm-Traktes, Gefäßwänden und der Milz sowie Federn (in Schaft und Kiel) Antigen nachweisen. Negative Befunde in der IHC ergaben sich bei Zunge, Trachea, Lunge, Kopfhöhlen, Syrinx, Schilddrüse und Nebenschilddrüse, Tibiotarsus und Thymus (Leal de Araujo *et al.*, 2017).

III. Material und Methoden

3.1. Tierauswahl

Für die hier vorliegenden Untersuchungen wurden 130 verschiedene Papageienvögel aus 27 Spezies (Tabelle 1) untersucht.

Alle 130 Papageienvögel waren als Patienten in der Klinik für Vögel, Kleinsäuger, Reptilien und Zierfische der Ludwig-Maximilians-Universität München im Zeitraum zwischen Januar 2014 und Dezember 2016 vorstellig geworden oder in diesem Zeitraum zur Sektion eingesandt worden. Bei 105 Papageienvögeln (80 %) wurde aus tierschutzrechtlichen Gründen und unabhängig von der vorliegenden Studie nach klinischer Untersuchung eine Euthanasie der Vögel aus Tierschutzgründen für medizinisch notwendig erachtet. 17 einbezogene Vögel (13 %) waren tot aufgefunden worden, acht (6 %) verstarben trotz intensiver tierärztlicher Bemühungen im Zeitraum der Behandlung.

Tabelle 1: Auflistung der in der vorliegenden Studie untersuchten 130 Papageienvögel, nach Art, wissenschaftlichem Namen, der jeweiligen Anzahl und mit Bornavirus infizierten Tiere

Art	Wissenschaftlicher Name	Anzahl gesamt	Anzahl Bornavirus positiv
Cacatuidae			
Nymphensittich	<i>Nymphicus hollandicus</i>	10	0
Inka Kakadu	<i>Cacatua leadbeaten</i>	2	0
Rosakakadu	<i>Eolophus roseicapilla</i>	1	0
Psittacidae			
Wellensittich	<i>Melopsittacus undulatus</i>	72	0
Kongo-Graupapagei	<i>Psittacus erithacus</i>	15	7
Ziegensittich	<i>Cyanoramphus novaezelandiae</i>	4	0
Unzertrennlicher	<i>Agapornis</i> sp.	3	0
Edelpapagei	<i>Eclectus roratus</i>	3	0
Amazona species			
Blaustirn-Amazone	<i>Amazona aestiva</i>	2	2
Granada-Amazone	<i>Amazona rhodocorytha</i>	1	1
Jamaika-Amazone	<i>Amazona collaria</i>	1	0
Kuba-Amazone	<i>Amazona leucocephala</i>	1	1
Venezuela-Amazone	<i>Amazona amazonica</i>	1	0

Ara species			
Dunkelroter Ara/ Grünflügelara	<i>Ara chloroptera</i>	1	0
Gelbbrustara	<i>Ara ararauna</i>	1	1
Großer Soldatenara/ Bechsteinara	<i>Ara ambiguus</i>	1	0
Hahns Zwergara/ Blaustirnzwergara	<i>Diopsittaca nobilis</i>	1	0
Hybridara		1	1
Andere			
Erzlori	<i>Lorius domicella</i>	1	0
Grüner Kongopapagei	<i>Poicephalus gulielmi</i>	1	0
Prachtrosella	<i>Platycercus eximius</i>	1	1
Rostkappenpapagei	<i>Pionites leucogaster</i>	1	0
Schwarzohrpapagei	<i>Pionus menstruus</i>	1	0
Sonnensittich	<i>Aratinga solstitialis</i>	1	0
Sperlinspapagei	<i>Forpus</i> sp.	1	0
Stellalori/ Papualori	<i>Charmosyna papou</i>	1	0
Timneh-Graupapagei	<i>Psittacus timneh</i>	1	0

44 der 130 Papageienvögel waren weiblich (34 %), 81 männlich (62 %) und bei fünf (4 %) war das Geschlecht nicht bekannt. Das Alter der Tiere war bei 113 (87 %) der 130 Vögel bekannt und variierte zwischen sechs Monaten und 37,5 Jahren (arithmetischer Mittelwert 5,77 Jahren). Dabei waren 13 Vögel (11,5 %) bis zu einem Jahr alt, 18 Vögel (15,9 %) über ein Jahr und bis inklusive zwei Jahren alt, 45 Vögel (39,8 %) über zwei und bis inklusive fünf Jahre alt, 26 Vögel (23 %) über fünf Jahre bis inklusive 10 Jahre alt, 11 Vögel (9,8 %) waren über 10 Jahre alt. Bei 17 Papageienvögeln (13 %), von denen jedoch nur ein Tier juvenil war, war das genaue Alter unbekannt.

Eine detaillierte Übersicht über die untersuchten Papageienvögel mit Alter, Geschlecht, Euthanasiebegündung, andere Erkrankungen außer Bornavirus-Infektionen sowie der Entnahmezeit der Organproben bis zum Beginn der Fixation in Zamboni-Medium (Ausnahme Kongo-Graupapageien (*Psittacus erithacus*) #33404 und #45040, diese Vögel wurden in Formalin fixiert) ist in der Tabelle A im Anhang dargestellt.

Bei 14 der 130 Papageienvögel war eine Infektion mit Bornaviren nachgewiesen (Tabelle 1). Davon waren sieben Papageienvögel weiblich, sechs männlich und ein

Tier mit unbekanntem Geschlecht. Das Alter der mit Bornaviren infizierten Papageienvögel variierte zwischen sechs Monaten und 19 Jahren (arithmetischer Mittelwert 7,41 Jahre), bei drei adulten Tieren war das genaue Alter unbekannt. Dabei war ein Vogel (9 %) unter einem Jahr alt, zwei Vögel (18,2 %) über einem Jahr bis inklusive zwei Jahre alt, ein Vogel (9 %) über zwei Jahre bis inklusive fünf Jahre alt, vier Vögel (36,4 %) über fünf Jahre alt bis inklusive 10 Jahre und drei Vögel (27,3 %) über 10 Jahre alt. Die nachgewiesene Mindestinfektionsdauer mit Bornaviren (also der zeitliche Abstand zwischen Nachweis der Infektion und Euthanasie oder Tod des Vogels) lag zwischen null Tagen (die Tiere verstarben, bevor der Nachweis der Bornavirus-Infektion vorlag) und 4,25 Jahren.

Eine Übersicht der klinischen Daten der Bornavirus-positiven Papageienvögel mit Art, Alter, Datum der Erstvorstellung in der Klinik, erster positiver Bornavirusnachweis, Todestag und Mindestdauer der Bornavirus-Infektion, sind in Tabelle B im Anhang dargestellt.

3.2. Probengewinnung

Die Durchführung der Euthanasie der Papageien der vorliegenden Studie erfolgte unter Allgemeinanästhesie als Inhalationsanästhesie mit Isofluran (IsoFlo®, Albrecht, Aulendorf, Deutschland), mittels Isoflurane Vapor 19,3 (Drägerwerk AG, Lübeck, Deutschland) und einer Anflutung mit 5 Volumen % in einer Kopfkammer. In der Phase der allgemeinen chirurgischen Toleranz, definiert nach Korbel *et al.* (1998) durch einen Reflexscore mit 4 von 29 möglichen Punkten (verlangsamter, aber vollständiger Kornealreflex, unvollständige Mydriasis und Pupillenreflex auf Lichteinfall) erfolgte eine intravenöse Injektion von T61 (Wirkstoffe: 200 mg Embutramid, 50 mg Mebezonium und 5 mg Tetracain Hydrochlorid pro ml, MSD Animal Health, Unterschleißheim/ Köln, Deutschland) in der Dosis von 0,5 ml bis 2 ml pro Tier.

Die Zeit vom festgestellten Todeszeitpunkt der Papageienvögel bis zur Gewebeentnahme und Verbringung des Kopfes in Zambonifixierlösung betrug bei 42 Vögeln (32,3 %) zwischen 15 und 30 Minuten, bei 36 Vögeln (27,7 %) über 30 Minuten bis inklusive 60 Minuten, bei 11 Vögeln (8,5 %) über 60 Minuten und bis

inklusive 120 Minuten und bei 41 Vögel (31 %) betrug sie mehr als 120 Minuten. Da 17 Tiere morgens tot in den Patienten-Boxen aufgefunden wurden, ist hier eine genaue Angabe zum Todeszeitpunkt und der folgenden Verarbeitungszeit nicht möglich. Zur Vereinheitlichung wurde bei diesen Proben Mitternacht als Todeszeitpunkt festgelegt.

Allen Papageienvögeln wurde unverzüglich nach der Euthanasie, bei tot aufgefundenen Vögeln so schnell als möglich, in der hauseigenen Pathologie die Hardersche Drüse entnommen. Da bei den meisten Tieren, die *Glandula membranae nictitantis* aufgrund des umfangreichen retrobulbären Fettgewebes nicht identifizierbar und so eine isolierte Entnahme nicht möglich war, wurde die Hardersche Drüse in der Regel zusammen mit dem periokulären Gewebe entnommen und in Zamboni-Fixiermedium (siehe Kapitel 3.3.2. „Zamboni-Fixiermedium“) fixiert. Als nächstes wurde der Tierkörper dekapitiert und der Schädel median mit einem Messer gespalten. Dann wurde mit der Spitze eines frischen Skalpells der rostrale Bereich einer Gehirnhälfte abgestochen und herausgehoben. Die so entstandene Gehirngewebeprobe hatte Mindestmaße von 0,5 x 0,5 x 0,5 cm. Sie wurde zusammen mit Gewebeproben von Leber und Darm (inklusive Pankreas), die mittels Scherenschlag gewonnen wurden, mit den Mindestmaßen von jeweils 0,5 x 0,5 x 0,5 cm –nach Organen getrennt- in eine 6-Loch-Platte verbracht und bis zur weiteren Bearbeitung (molekularbiologisch mittels PCR) bei -80 °C eingefroren. Der restliche Kopf wurde in Zamboni-Fixiermedium konserviert.

In der Regel lag der gesamte Tierkörper zur Untersuchung vor, lediglich bei drei Vögeln konnten nur Proben der Harderschen Drüsen entnommen werden (Tabelle 2).

Tabelle 2: Übersicht über die Papageienvögel, von denen nicht der gesamte Tierkörper zur Untersuchung vorlag mit Angabe des vorhandenen Untersuchungsmaterials (HD, Hardersche Drüse). X = vorhanden

VeteraNr.	Tierart	HD rechts	HD links
32778	Edelpapagei	x	x
36790	Erzlori	x	
38038	Soldatenara	x	x

Alle Tiere der vorliegenden Studie wurden in der klinikeigenen virologischen Abteilung molekularbiologisch auf Bornaviren untersucht. Die Diagnostik wurde freundlicherweise von den MitarbeiterInnen der Abteilung durchgeführt. Dazu wurde eine im Vorfeld entnommene Blutprobe mittels ELISA zum Nachweis von Bornavirus-Antikörpern, wie bei Högemann (2018) beschrieben, untersucht (bis auf die Bornavirus-infizierten Vögel #34349, #37929, #38763 (*Psittacus erithacus*) und #37676 (*Amazona aestiva*), für die keine Blutproben verfügbar waren). Zudem durchlief eine gepoolte Probe jedes Papageienvogels aus den zwischenzeitlich tiefgefrorenen Gewebeproben von Gehirn, Leber und Darm (inklusive Pankreas) nach Reverser Transkription sowohl eine RT-PCR (Honkavuori *et al.*, 2008) als auch eine konventionelle PCR (Kistler *et al.*, 2008). Durch Sequenzierung der in der konventionellen PCR erhaltenen Produkte erfolgte die Identifizierung von Virustyp PaBV-2 oder PaBV-4.

3.3. Verwendete Chemikalien

3.3.1. Alkoholreihe

Lösungen	Chemikalien (Hersteller)
Clearant (AppliClear Xylol-Ersatz)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Xylol p.A.	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Alkohol 100 %	Ethanol 99 % (V/V) vergällt (CLN, Freising, Deutschland)
Alkohol 96 %	verdünnt mit Aqua demin. aus Ethanol 99 % (V/V) vergällt (CLN, Freising, Deutschland)
Alkohol 80 %	verdünnt mit Aqua demin. aus Ethanol 99 % (V/V) vergällt (CLN, Freising, Deutschland)
Alkohol 70 %	verdünnt mit Aqua demin. aus Ethanol 99 % (V/V) vergällt (CLN, Freising, Deutschland)
Alkohol 50 %	verdünnt mit Aqua demin. aus Ethanol 99 % (V/V) vergällt (CLN, Freising, Deutschland)
Aqua demin.	hier: VE-Wasser (vollentsalzt)

3.3.2. Zamboni-Fixiermedium

Lösungen	Chemikalien (Hersteller)
Sörensen-Puffer	Di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4) (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
	H_2O
	Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
	Natronlauge (NaOH), 25%ig und 50%ig (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
	22,39 g Na_2HPO_4 + 2 H_2O und 4,08 g KH_2PO_4 in 800 ml Aqua demin. lösen
	mit konzentriertem NaOH auf pH-Wert 7,45 einstellen
	mit Aqua demin. auf 1000 ml auffüllen
	Paraformaldehyde extra pure (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
	gesättigte Pikrinsäure (Picric Acid-Solution 1,2%, AppliChem, Darmstadt, Deutschland)
	40 g Paraformaldehyd und 850 ml Sörensen-Puffer bei 100 °C auf dem Magnetrührer ein bis zwei Stunden rühren, bis die Lösung klar ist
	bei Zimmertemperatur abkühlen
	150 ml Pikrinsäure (1,2 %) zugeben
	zur längeren Lagerung in Aliquots zu 80-90 ml einfrieren

3.3.3. Standardfärbung Hämatoxylin-Eosin

Lösung	Chemikalien (Hersteller)
Hämatoxylin	Hämatoxylin (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
	Natriumjodat (NaJO_3) (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
	Kaliumaluminiumsulfat Dodecahydrat (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
	Chloralhydrat (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
	Zitronensäure Monohydrat (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
	1 g Hämatoxylin in 1000 ml Aqua demin. lösen, 200 mg Natriumjodat (NaJO_3) und 50 g Kalialaun in der Hämatoxylinlösung unter Schütteln lösen; die so erhaltene Lösung soll blaviolett sein. 50 g Chloralhydrat (Stabilisator) und 1 g Zitronensäure zugeben Farbumschlag nach rotviolett
Eosin	Eosin G (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)

	Eisessig (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
	0,1 % Eosinlösung 1 g Eosin in 100 ml Aqua demin. lösen. Vor Gebrauch 1:10 verdünnen und pro 100 ml 1 Tropfen Eisessig zugeben.

3.3.4. Spezialfärbungen

3.3.4.1. Immunhistochemische Färbung Bornavirus

Lösung	Chemikalien (Hersteller)
PBS-Pulver	Dulbecco´s PBS ohne Ca ²⁺ / Mg ²⁺ (Trockensubstanz) (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
	Stammlösung: 477.75g PBS-Pulver + 5 Liter Aqua demin.
	Gebrauchslösung: 500 ml PBS (10x Stammlösung) + 4,5 Liter Aqua demin., pH auf 7.4 einstellen
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid 30 % (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
Ziegenserum	Goat-Serum, sterile filtered (Biowest, Nuaille, Frankreich)
Primärantikörper Bornavirus	Anti-PaBV-2-Nukleoprotein (rekombinant), Kaninchen-polyklonal, zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. B. Kaspers (Veterinärwissenschaftliches Department, Institut für Physiologie, LMU München)
Antikörperstammlösung	Ansatz: 40 ml PBS 1fach + 2 ml Ziegenserum + 40 µl 10 % NaN ₃
Sekundärantikörper Bornavirus	Biotinylated Anti-Rabbit IgG (H+L) (made in Goat) 1,5 mg (Vector Laboratories Inc., Burlington, CA, USA)
ABC-Lösung	Vectastain ABC-Kit (Firma Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, Deutschland)
DAB	3,3-Diaminobenzidin, DAB-Puffertabletten für die Immunhistochemie (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
	eine Tablette auf 15 ml Aqua demin., mindestens eine Stunde rühren unter Lichtabschluss (unter einer Pappbox), portionsweise abfüllen + einfrieren, bei Verwendung pro 1 ml 3µl H ₂ O ₂ 30 % zur Aktivierung dazu geben

3.3.4.2. Immunhistochemische Färbung β -III-Tubulin

Lösungen	Chemikalien (Hersteller)
Citratpuffer	Citronensäure C ₆ H ₈ O ₇ (Carl Roth GmbH + Co. KG, X863.2, Karlsruhe, Deutschland)
	10,5 g Citronensäure + 5 Liter Aqua demin., pH auf 6.0 einstellen
PBS	Dulbecco's PBS ohne Ca ²⁺ / Mg ²⁺ (Trockensubstanz) (Biochrom GmbH, L182-50, Berlin, Deutschland)
	Stammlösung: 477.75g PBS-Pulver + 5 Liter Aqua demin.
	Gebrauchslösung: 500 ml PBS (10x Stammlösung) + 4,5 Liter Aqua demin., pH auf 7.4 einstellen
Primärantikörper β -III-Tubulin	Anti- β -III-Tubulin, Maus-Monoclonal, IgG-2a Fraktion (abcam, AB 78078, Cambridge, MA, USA)
Ziegenerum	Normal Goat Serum (Vector Laboratories, S-1000, Burlingamen, CA, USA)
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid 30 % (Carl Roth GmbH + Co. KG, 8070.4, Karlsruhe, Deutschland)
Sekundärantikörper β -III-Tubulin	Biotinylated Anti-Maus IgG (H&L), Affinity Purified, Made in Goat (Vector Laboratories, BA-9200, Burlingamen, CA, USA)
ABC-Lösung	Vectastain Elite Kit (Vector Laboratories, PK-6100, Burlingamen, CA, USA)
DAB	3,3-Diaminobenzidin
	DAB+ Substrat Puffer (Agilent Technologies GmbH & Co. KG, DAKO, K3468, Waldbronn, Deutschland)
	DAB+ Chromogen (Stock) (Agilent Technologies GmbH & Co. KG, DAKO, K3468, Waldbronn, Deutschland)
	28 μ l DAB Stock + 1372 μ l DAB Substrat

3.4. Anfertigung histologischer Präparate

Die kompletten Köpfe der Papageienvögel mussten vor der histologischen Verarbeitung entkalkt werden. Hierzu wurde Osteosoft mild decalcifier-solution for histology® (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Die Entkalkungsdauer wurde individuell festgelegt. Je nach Kalzifizierungszustand und Größe des Präparates konnte es zwischen wenigen Tagen und mehreren Monaten dauern, bis die Präparate weiter zugeschnitten und eingebettet werden konnten. Bei großen Tieren (wie z. B. Aras) oder auch Papageien mit einem besonders robusten

Schnabelhorn (wie z. B. den Amazonen) erfolgte eine Abtrennung des Schnabels mit einer oszillierenden Säge (Elektronik Power Autopsiesäge, 230Volt/50Herz/500Watt, 6500-24000 Schwingungen, Deutschland) nach den ersten Entkalkungsmediumwechseln, die den Schädel erweicht hatten, um den weiteren Entkalkungsprozess zu beschleunigen. Zur Beurteilung des Entkalkungsgrades wurden Röntgenbilder (Gierth HF 400 A mit Anatomieprogramm, High Frequency Diagnostic X-Ray Unit, Röntgenröhre XD4-120, Riesa, Deutschland) mit einer Spannung von 44 kV und 3,45 mAs Energie bei einem Film-Fokusabstand von 80 cm auf Röntgenplatten (Agfa CR HD 5.0 FLFS Directrix microspot Exam, Agfa Health Care NV, Mortsel, Belgien) angefertigt. Nach Entwicklung der Bilder erfolgte die visuelle Auswertung mit Vergleichsbildern der vorherigen Woche, um den Verkalkungszustand der Präparatsteile zu beurteilen. Bei zweimal in Folge fehlenden weiteren Entkalkungserfolgen wurde mit der histologischen Entwässerung und Einblockung begonnen. In variierenden Abständen wurde ein Wechsel der Entkalkerlösung durchgeführt, hierzu wurde die verbrauchte Entkalkerlösung abgegossen und neue Flüssigkeit in den Behälter mit dem zu entkalkenden Papageienkopf gegeben und darauf geachtet, dass der Kopf komplett von Entkalkerflüssigkeit bedeckt war.

Der Zuschnitt der entkalkten Papageienköpfe erfolgte je nach Größe der Tiere unterschiedlich und wie folgend beschrieben in zwei bis drei Gewebelöcke pro Kopfhälfte und somit in vier bis sechs Gewebelöcke pro Kopf. Zunächst wurde bei allen Tieren der gesamte Schädel median halbiert und das Schnabelhorn kaudal der Nasenlöcher abgesetzt.

Bei Wellensittichen, Nymphensittichen und anderen kleinen Papageienvögeln, wie z. B. Ziegensittichen und Unzertrennlichen, wurden nur zwei Gewebelöcke pro Kopfseite angefertigt. Der erste Gewebelöcke enthielt das Schädelgewebe bis zur rostralen Kante der Augenhöhle, der zweite Gewebelöcke die knöcherne Augenhöhle mit den kompletten erhaltenen Weichteilgewebestrukturen, die sie umgaben.

Bei größeren Papageienvögeln, wie z. B. Graupapageien, Amazonen und Aras, wurden drei Gewebelöcke pro Kopfhälfte angefertigt. Der erste Gewebelöcke enthielt das Schnabel- und Schädelgewebe bis zur rostralen Kante der Augenhöhle,

der zweite Gewebeblock die Scheibe von der rostralen Kante der Augenhöhle bis zum Ende der Nasenhöhle, der dritte Gewebeblock die kaudale Hälfte der Augenhöhle und Anteile der Schädelhöhle, eventuell mit Gehirn.

Dann wurden die Gewebelöcke beider Seiten bei Bedarf, meistens bei den sehr großen Tieren wie z. B. Aras, nochmals an den Kanten zugeschnitten, damit sie in die histologischen Einbettkassetten (Maße 3 x 2,6 cm, Einbettkassetten weiß 0,5 cm hoch, Megakassetten 1 cm hoch, beide MEDITE GmbH, Burgdorf, Deutschland) passten. Die Einbettung erfolgte stets so, dass die rostrale Fläche der Gewebestücke als Anschnittfläche im späteren Block vorlag. Die Gewebelöcke wurden in die histologischen Einbettkassetten eingelegt und dann mit dem zugehörigen Deckel verschlossen. Diese wurden in einen Entwässerungsautomaten (Spin Tissue Processor Microtom STP 120, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) überführt, dort maschinell entwässert und mit Paraffin (Tissue-Tek III Paraffin, Sakura Finetek, Europe, BV, Alphen aan den Rijn, Holland) durchtränkt (Tabelle 3).

Da bei den separat entnommenen periokularen Weichteilgewebestücken mit Harderschen Drüsen ein Entkalken nicht notwendig war, wurden diese nach frühestens zwei Tagen Fixierdauer aus dem Zamboni-Fixiermedium in ihrer histologischen Einbettkassette in den Entwässerungsautomaten überführt und ebenso wie die entkalkten Gewebelöcke nach Protokoll (Tabelle 3) automatisch paraffiniert. Die einzelnen Schritte sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Schritte zur Paraffinierung der entkalkten Gewebelöcke und der Weichteilgewebe mit Harderschen Drüsen im Spin Tissue Processor Microtom STP 120 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) mit durchlaufenem Medium und Zeitdauer.

Medium	Zeitdauer
Leitungswasser	60 Minuten
Alkohol 70 %	60 Minuten
Alkohol 70 %	120 Minuten
Alkohol 96 %	60 Minuten
Alkohol 96 %	60 Minuten
Isopropanol 100 %	60 Minuten
Isopropanol 100 %	60 Minuten
Clearant (Xylol-Ersatz)	60 Minuten

Clearant	60 Minuten
Clearant	60 Minuten
Paraffin	50 Minuten
Paraffin	50 Minuten
Paraffin	60 Minuten
Paraffin	80 Minuten
Gesamtdauer	15 Stunden

Das Ausgießen und Aufblocken erfolgte manuell am Einbettautomaten (Tissue-Tek Embedding Console, Model 4593, Sakura, Bayer Diagnostics, Orcq Tournai, Belgien). Zuerst wurden die Ausgießförmchen aus Stahlblech (Tissue-Tek, Sakura, Bayer Diagnostics, Orcq Tournai, Belgien) bis zur Hälfte der Form mit flüssigem Paraffin gefüllt und dann das, wie oben beschrieben vorbehandelte Präparat mit einer Pinzette so platziert, dass es gerade und mit der späteren Anschnittfläche nach unten durch Auflegen des Ausgießförmchens auf die Kühlplatte kurz anfixiert werden konnte. Der Deckel der zugehörigen histologischen Einbettkassette wurde waagrecht auf den Rand des Ausgießförmchens aufgelegt und das Ausgießförmchen aus Stahlblech mit dem aufliegenden Einbettkassettendeckel vollends bis zum oberen Rand mit Paraffin gefüllt und auf die Gefrierplatte des Einbettautomaten gestellt. Da das abkühlende Paraffin absackte, wurde das Ausgießförmchen aus Stahlblech erneut mit Paraffin nachgefüllt, bis der Boden des Deckels der Einbettkassette völlig mit Paraffin bedeckt blieb. Wenn das Paraffin völlig erkaltet war, was je nach Größe zwischen fünf und zehn Minuten dauerte, wurde der so entstandene Block aus dem Ausgießförmchen aus Stahlblech gelöst. Die Blöcke wurden bis zur Weiterverarbeitung bei Raumtemperatur gelagert.

Von den fertigen, erkalteten Blöcken wurden mit einem Schlittenmikrotom (SM 2000 R, Seriennummer 4167, LEICA, Biosystems GmbH, Nussloch, Deutschland) Schnitte von 4 µm bei weichem Gewebe, wie Gehirn und Harderscher Drüse, mit den Microtomklingen Feather Microtome Blade stainless Steel R35 (pfm medical AG, Köln, Deutschland) angefertigt. Für die gemischten Gewebe, die auch feste Strukturen enthielten, wie das Gehirn mit entkalktem umgebendem Schädel oder den Nasenhöhlen, wurden mit den Microtomklingen Feather Microtome Blade stainless Steel N35HR (pfm medical AG, Köln, Deutschland) Schnitte mit einer Schnittdicke von 6 µm bis zu 10 µm angefertigt, um einem Zerreißen der Präparate

entgegenzuwirken. Dabei wurde so dünn wie möglich, je nach Erhalt des Gewebes und des Blockinhaltes, geschnitten, ohne jedoch den Gewebezusammenhalt des Schnittes zu gefährden. In Tabelle C im Anhang sind die angefertigten Schnittdicken bei den einzelnen Tieren und den einzelnen Blöcken aufgeführt.

Dafür wurden die Anschnittflächen der Blöcke, die Weichgewebe wie Gehirn oder ausschließlich Drüsengewebe enthielten, zunächst fünf Minuten auf einer Kühlplatte (Kühlplatte COP 30, medite Medizintechnik, Burgdorf, Deutschland) auf 0 °C gekühlt. Blöcke, die hauptsächlich Schädelteile enthielten, wurden nicht gekühlt, da dieser Vorgang sich negativ auf die Schneidbarkeit des Gewebes auswirkte. Dann wurde mit dem Schlittenmikrotom von den Blöcken solange Material abgeschnitten, bis eine großflächige Präparatanschnittfläche des in diesem Block aufgesuchten Gewebes erreicht war. Das respiratorische Epithel wurde in dem Block der Nasenhöhle aufgesucht. Ebenso wurde die Nasendrüse im Bereich der Nasenhöhle untersucht. Die Tränendrüse und die Hardersche Drüse wurden in den Augenhöhlen-Blöcken gesucht, wobei die *Glandula membranae nictitantis* bei manchen Tieren durch separate Entnahme in einem einzelnen Block vorlag. Die Orientierung der einzelnen Gewebeblöcke wurde stets so gewählt, dass eine Schnittführung von rostral nach kaudal erfolgte. Eine Ausnahme bildeten die Blöcke, in denen exemplarisch das olfaktorische Epithel aufgesucht wurde. Hier erfolgte die Einbettung in den Block mit der medianen Fläche als Anschnittfläche, es wurden Serienschnitte nach lateral abgetragen.

Alle Schnitte wurden mittels nassen Blumenseidenpapierstreifen von der Klinge des Schlittenmikrotoms abgehoben und zur Streckung in ein 48 °C (Ausnahme Gehirn: nur 42 °C) warmes Wasserbad (Wasserbad, Model HI 1210, LEICA, Biosystems GmbH, Nussloch, Deutschland) mit destilliertem Wasser gebracht. Dann wurden die Schnitte auf Objektträger (medizinische Objektträger mit einseitigem farbigem Mattrand, 26 x 76 mm, 1-1,2 mm stark, medite Medizintechnik, Burgdorf, Deutschland) aufgefischt.

Mittels einer Labor-Stereolupe mit Durchlichtbeleuchtung wurden die Schnitte dahingehend untersucht, ob sie das in dieser Studie zu untersuchende Gewebe enthielten. War dies nicht der Fall, wurden jeweils weitere 10 Schnitte à 10 µm vom Block abgetragen und erneut, wie oben beschrieben, nach dem zu untersuchenden

Gewebe gesehen. Unter Umständen wurde der Vorgang so lange wiederholt, bis sich das zu untersuchende Gewebe auf dem Objektträger befand oder der Block ohne das Auffinden von dem zu untersuchenden Gewebe aufgearbeitet war. Nach Auffinden des zu untersuchenden Gewebes wurden weitere 10 Schnitte angefertigt und alle zehn Objektträger der weiteren histologischen Verarbeitung zugeführt. Zur Darstellung des olfaktorischen Epithels mit Riechnerven wurden Serienschnitte nach lateral abgetragen und Schnitte vom Beginn des Erscheinens des Riechnerven bis zu seinem Ende auf Objektträger aufgezo- gen. Für die Schnitte, die einer immunhistochemischen Färbung zugeführt werden sollten, wurden SuperfrostPlus® Objektträger (75 x 25 mm, Thermo Scientific, Menzel Gläser, Braunschweig, Deutschland) verwendet. Zur Trocknung wurden alle Objektträger 30 Minuten auf einem Objektträgerständer auf einer Heizplatte (Heizplatte, Typ 3P13, MEDAX, Nagel GmbH, Kiel, Deutschland) bei 48 °C getrocknet und dann über Nacht bei 48 °C im Trockenschrank (UTI2P, Thermo Fisher Scientific, Haereus Instruments, Hanau, Deutschland) gelagert.

Am nächsten Tag wurden aus den zehn Schnitten die vier Schnitte ausgewählt, die das gesuchte Gewebe am großflächigsten enthielten und keine technischen Defekte sowie den besten Gewebeerhalt aufwiesen, und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt (Tabelle 4). Das Eindecken erfolgte mit Eukitt® (ehem. O. Kindler GmbH & Co, jetzt ORSAtec GmbH, Bobingen, Deutschland) und mit Deckgläsern (23,8 x 50 mm #1, 0,13-0,17 mm, medite Medizintechnik, Burgdorf, Deutschland).

Tabelle 4: Arbeitsschritte zur Färbung mit Hämatoxylin-Eosin.

Medium	Zeitdauer	Bemerkungen
Xylol	10 Minuten	
Xylol	10 Minuten	
Xylol + Alkohol 100 %	5 Minuten	im Verhältnis 2:1
Alkohol 100 %	3 Minuten	
Alkohol 100 %	3 Minuten	
Alkohol 96 %	3 Minuten	
Alkohol 80 %	3 Minuten	
Alkohol 70 %	3 Minuten	
Alkohol 50 %	3 Minuten	
Aqua demin.	3 Minuten	
Hämatoxylin	7 Minuten	
Aqua demin.	3 mal eintauchen	

Leitungswasser	10 Minuten	fließend
Aqua demin.	3 mal eintauchen	
Eosin	5 Minuten	wässrig, 0,1 %
Aqua demin.	3 mal eintauchen	
Alkohol 70 %	3 mal eintauchen	
Alkohol 80 %	3 mal eintauchen	
Alkohol 96 %	1 Minute	
Alkohol 100 %	2 Minuten	
Alkohol 100 %	2 Minuten	
Xylol + Alkohol 100 %	5 Minuten	im Verhältnis 2:1
Xylol	10 Minuten	
Xylol	10 Minuten	
eindecken mit Eukit®		

Unter dem Axiophot Fluoreszenz Phasenkontrast Mikroskop #5592 (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) wurden auf den gefärbten Schnitten Bereiche ausgewählt, die das zu untersuchende Gewebe gut repräsentierten. Diese Bereiche wurden dann unter der Verwendung von benachbarten, noch ungefärbten Schnitten, mit den nachfolgend beschriebenen Färbungen genauer untersucht.

Zum Nachweis von Bornavirus-Antigen wurde ein polyklonaler Anti-PaBV-N-Protein-Antikörper aus dem Kaninchen verwendet (Kaspers, 2018, persönliche Mitteilung). Die Schritte der immunhistochemischen Färbung sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5: Arbeitsschritte zum immunhistochemischen Nachweis von PaBV-N-Protein in histologischen Schnitten von Papageienvögeln.

Medium	Zeitdauer	Bemerkungen
Xylol	5 Minuten	
Xylol	5 Minuten	
Isopropyl + Alkohol 100 %	5 Minuten	im Verhältnis 2:1
Alkohol 100 %	2 Minuten	
Alkohol 100 %	2 Minuten	
Alkohol 96 %	2 Minuten	
Alkohol 80 %	2 Minuten	
Alkohol 70 %	2 Minuten	
Alkohol 50 %	2 Minuten	
Aqua demin.	3 Minuten	

H ₂ O ₂ 0,3 %	13 Minuten	Stammlösung mit PBS 1fach verdünnt
PBS 1fach	3 mal eintauchen	
Ziegenserum 3 %	45 Minuten	Stammlösung mit PBS 1fach verdünnt
Primärantikörper 1:1000	über Nacht	verdünnt in Antikörperstammlösung, Inkubation bei 4°C
PBS 1fach	5 Minuten	
PBS 1fach	5 Minuten	
PBS 1fach	5 Minuten	
Sekundärantikörper 1:200	60 Minuten	Verdünnt mit PBS 1fach
PBS 1fach	5 Minuten	
PBS 1fach	5 Minuten	
PBS 1fach	5 Minuten	
ABC-Kit: Lösung A und B	60 Minuten	jeweils 1ml PBS 1fach + 10µl A + 10µl B
PBS 1fach	5 Minuten	
PBS 1fach	5 Minuten	
PBS 1fach	5 Minuten	
DAB (3,3',4,4' –Tetraaminobiphenyl- tetrahydrochlorid)	10 Minuten	Toxisch! (Handschuhe)
Leitungswasser	3 mal eintauchen	
Mayers Häkalaun	5 Sekunden	
Aqua demin.	3 mal eintauchen	
Leitungswasser	10 Minuten	fließend
Aqua demin.	3 mal eintauchen	
Alkohol 70 %	3 mal eintauchen	
Alkohol 80 %	3 mal eintauchen	
Alkohol 96 %	1 Minute	
Alkohol 100 %	2 Minuten	
Alkohol 100 %	2 Minuten	
Alkohol 100 % + Isopropyl	5 Minuten	Verhältnis 2:1
Xylol	10 Minuten	
Xylol	10 Minuten	
eindecken mit Eukitt®		

Um den Riechnerven im Bereich der olfaktorischen Schleimhaut darzustellen, wurden einige ausgewählte Serienschnitte mit immunhistochemischer β -III-Tubulin-Färbung bearbeitet.

Die Arbeitsschritte der β -III-Tubulin-Färbung (Tabelle 6) entsprachen weitestgehend dem der immunhistochemischen Färbung zur Detektion von PaBV-N-Protein. Hier wurde aber zusätzlich nach dem Entparaffinieren ein Kochvorgang in Citratpuffer durchgeführt, um die Zellmembranpermeabilität des Gewebes zu verbessern.

Tabelle 6: Arbeitsschritte der β -III-Tubulin-Färbung zum Nachweis der Riechnerven im Bereich der Riechschleimhaut von Psittaziden.

Medium	Zeitdauer	Bemerkungen
Xylol	10 Minuten	
Xylol	10 Minuten	
Xylol + Alkohol 100%	5 Minuten	im Verhältnis 2:1
Alkohol 100 %	3 Minuten	
Alkohol 100 %	3 Minuten	
Alkohol 96 %	3 Minuten	
Alkohol 80 %	3 Minuten	
Alkohol 70 %	3 Minuten	
Alkohol 50 %	3 Minuten	
Aqua demin.	3 Minuten	
Citratpuffer	10 Minuten	kochen (in der Mikrowelle, bei 638Watt)
PBS 1fach	5 Minuten	
PBS 1fach	5 Minuten	
PBS 1fach	5 Minuten	
Ziegenserum 5 %	60 Minuten	Stammlösung verdünnt mit PBS 1fach
Primärantikörper 1:1000	über Nacht	Stammlösung verdünnt in 5 % Ziegen-Serum mit PBS 1fach, Inkubation bei 4°C
PBS 1fach	5 Minuten	
PBS 1fach	5 Minuten	
PBS 1fach	5 Minuten	
H ₂ O ₂ 0,3 %	30 Minuten	Stammlösung verdünnt mit PBS 1fach, unter Lichtabschluss
PBS 1fach	5 Minuten	
PBS 1fach	5 Minuten	
PBS 1fach	5 Minuten	
Sekundärantikörper 1:200	60 Minuten	Stammlösung verdünnt in 5 % Ziegen-Serum mit PBS 1fach
PBS 1fach	5 Minuten	

PBS 1fach	5 Minuten	
PBS 1fach	5 Minuten	
ABC-Kit: Lösungen A und B	60 Minuten	Stammlösung verdünnt 1:50 mit PBS 1fach
PBS 1fach	5 Minuten	
PBS 1fach	5 Minuten	
PBS 1fach	5 Minuten	
DAB (3,3-Diaminobenzidin)	10 Minuten	Stammlösung verdünnt 1:50 mit PBS 1fach, toxisch!
Leitungswasser	3 mal eintauchen	
Aqua demin.	5 Minuten	
Mayers Hämalan	45 Sekunden	
Aqua demin.	3 mal eintauchen	
Leitungswasser	10 Minuten	fließend
Aqua demin.	3 mal eintauchen	
Alkohol 50 %	3 Minuten	
Alkohol 70 %	3 Minuten	
Alkohol 96 %	3 Minuten	
Alkohol 96 %	3 Minuten	
Alkohol 100 %	3 Minuten	
Alkohol 100 %	3 Minuten	
Alkohol 100% + Xylol	5 Minuten	im Verhältnis 2:1
Xylol	10 Minuten	
Xylol	10 Minuten	
eindecken mit Eukitt®		

Die gefärbten Schnitte, die das zu untersuchende Gewebe am besten darstellten, wurden für die Fotodokumentation ausgewählt. Photographien wurden mit der HAL 100 (12 Volt max 100 W, 447219, 1039-685, Carl Zeiss, Jena, Deutschland) gekoppelt an das Axiophot Fluoreszenz Phasenkontrast Mikroskop #5592 (Carl Zeiss, 451887, Jena, Deutschland) mit Plan-Neofluar Objektiven (5x/0,15, ∞ 0,17, 440320; 10x/0,30, ∞ 0,17, 440330; 20x/0,15, ∞ 0,17, 440340) und mit der Software AxioVision (Version „Axio Vision Special Edition 64bit Release 4.9.1 SP2 (10-2015)“ (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) angefertigt. Die Photographien wurden unter Verwendung eines 20fach vergrößernden Objektives erstellt oder, bei großen Präparaten, in einer geringeren Vergrößerung angefertigt und durch Detailaufnahmen mit dem 20fach vergrößernden Objektiv ergänzt. Es erfolgte keine Bearbeitung der Fotos, um ein realistisches, unoptimiertes Bild der im

Laboralltag angefertigten Präparate zu erhalten. Damit sollte eine bessere Vergleichbarkeit mit Präparaten, die im Labor selbst angefertigt werden, als mit dem optimierten Bildmaterial aus Lehrbüchern gewährleistet werden.

IV. Ergebnisse

Durch die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung), die das in der Histologie am häufigsten verwendete Standardverfahren ist, werden saure, basophile Strukturen blau gefärbt und alle basischen Anteile rot. Dadurch stellen sich vor allem Zellkerne mit ihrer enthaltenen Desoxyribonukleinsäure (DNA) und das raue endoplasmatische Retikulum (rER), welches mit Ribosomen besetzt ist, blau dar. Die Interzellulärsubstanz und basische Anteile des Zytoplasmas färben sich im Gegensatz dazu rot (Sinowatz & Rodler, 2011).

Das respiratorische Epithel wurde auf der *Concha nasalis media* beurteilt, wenn es die Qualität der Erhaltung des Gewebes ermöglichte. Vollmerhaus & Sinowatz (2004) beschreiben die *Concha nasalis media* als größte Nasenmuschel, die schneckenhausförmig nach ventral eingerollt ist. Bei den in dieser Studie untersuchten Papageienvögeln konnten stets eine Einrollung nach ventral und zusätzlich nach dorsal beobachtet werden, allerdings waren die Windungen nicht so stark ausgeprägt wie bei Säugetieren.

3.1. Respiratorische Schleimhaut (*Regio respiratoria*)

3.1.1. Wellensittich (*Melopsittacus undulatus*)

Die Auskleidung der Nasenhöhle bestand beim Wellensittich aus einem mehrreihigen, hochprismatischen Flimmerepithel mit zahlreichen, meist mehrzelligen exokrinen, endoepithelialen, mukösen oder mukoazinären Drüsen und möglicherweise auch mit einzelligen Becherzellen (Abb. 1a, b). Während alle Epithelzellen der Basalmembran aufsaßen, erreichten nicht alle das freie Lumen der Nasenhöhle. Dadurch lagen nicht alle Kerne auf der gleichen Höhe. Wenn eine Zelle die Oberfläche und somit das Lumen der Nasenhöhle erreichte, dann trug sie Kinozilien. Die schleimabsondernden Drüsenzellen im Epithel saßen mit ihrem basalen Anteil fast vollständig der Basallamina auf.

Die *Concha nasalis media* wurde am konvexen Teil der Windung, vor allem im Randbereich, in der *Lamina propria mucosae* von vielen Blutgefäßen durchzogen.

Bei Wellensittich #19995 waren diese deutlich zu erkennen, da sie hochgradig mit Erythrozyten angefüllt waren (Abb. 1a). Das respiratorische Epithel auf der konkaven Fläche der Windung oder dem *Septum nasi* war dagegen nur gelegentlich von Gefäßen unterlagert, die nicht so voluminös ausgebildet waren, und hatte eine weniger stark ausgebildete *Lamina propria mucosae* (Abb. 1b).

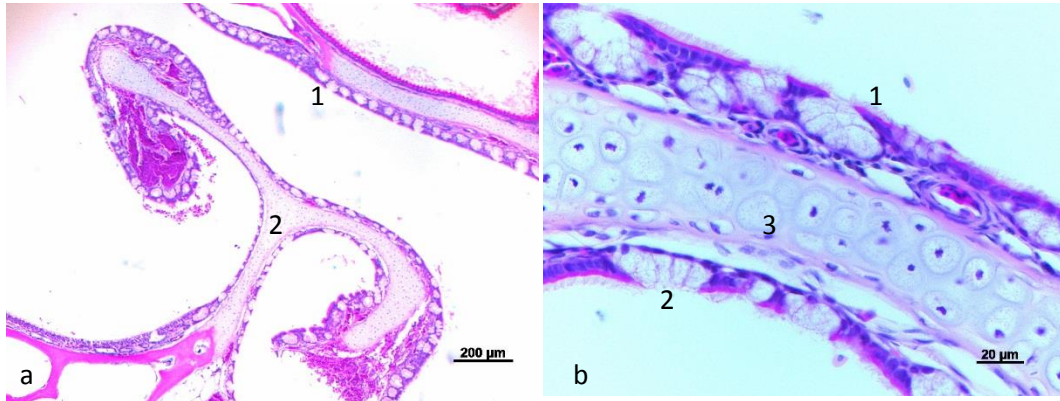


Abb. 1 a) Wellensittich #19995, respiratorisches Epithel auf *Concha nasalis media* und *Septum nasi*, Erythrozytenansammlung im Endbereich der *Concha*, respiratorisches Epithel mit mukösen Drüsen (1), Hyaliner Knorpel (2), Färbung Hämatoxylin-Eosin, b) respiratorisches Epithel mit untergelagerter *Lamina propria mucosae* mit Fibrozyten auf der konvexen Seite der Windung der *Concha nasalis media* (1), intraepitheliale, muköse Drüsen im respiratorischen Epithel auf der konkaven Seite der Windung der *Concha nasalis media* (2), Hyaliner Knorpel (3), Färbung Hämatoxylin-Eosin

3.1.2. Nymphensittich (*Nymphicus hollandicus*)

Auch bei Nymphensittichen ließ sich eine Einrollung der *Concha nasalis media* nach ventral und dorsal beobachten. Vor allem an der konvexen Fläche war der respiratorischen Schleimhaut eine Großzahl von Gefäßen untergelagert. Der Aufbau des Gewebes entsprach dem beim Wellensittich. Bei Nymphensittich #25693 konnte eine Füllung der Gefäße mit Erythrozyten beobachtet werden (Abb. 2a), diese war jedoch nicht so stark ausgeprägt wie bei Wellensittich #19995 (Abb. 1b). Dafür konnte bei Nymphensittich #25693 deutlicher die Anzahl und die Verteilung der Blutgefäße um die ganze Windung der *Concha nasalis media* dargestellt werden (Abb. 2a). Bei Nymphensittich #34580 konnte eine Ruptur der

Gefäßwand und die Freisetzung der enthaltenen Erythrozyten dargestellt werden (Abb. 2b).

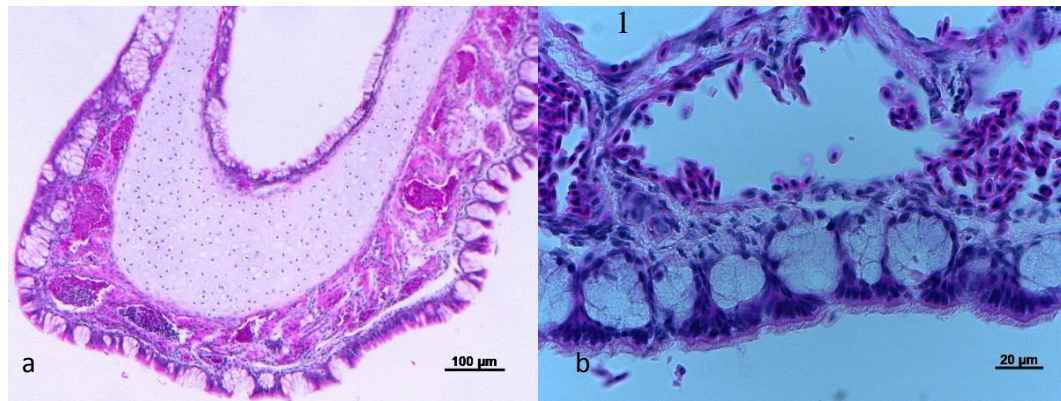


Abb. 2 a) Nymphensittich #25693, respiratorisches Epithel an konvexer Seite der Windung der *Concha nasalis media*, unterlagert von zahlreichen Blutgefäßen, die mit Erythrozyten angefüllt sind, Färbung Hämatoxylin-Eosin, b) Nymphensittich #34580, respiratorisches Epithel, 1: Ablösung der *Lamina propria mucosae* vom Knorpel, durch Ruptur der Blutgefäße Ablagerung von zahlreichen Erythrozyten, Färbung Hämatoxylin-Eosin

3.1.3. Ziegensittich (*Cyanoramphus novaezelandiae*)

Auch beim Ziegensittich war eine ventrale und dorsale Windung der *Concha nasalis media* zu beobachten. Der Aufbau des respiratorischen Epithels entsprach dem beim Wellensittich. Die Unterlagerung mit Blutgefäßen mit der zahlenmäßigen Häufung und dem größeren Lumen an der konvexen Fläche der *Concha nasalis media* war auch bei dieser Vogelart zu finden (Abb. 3b).

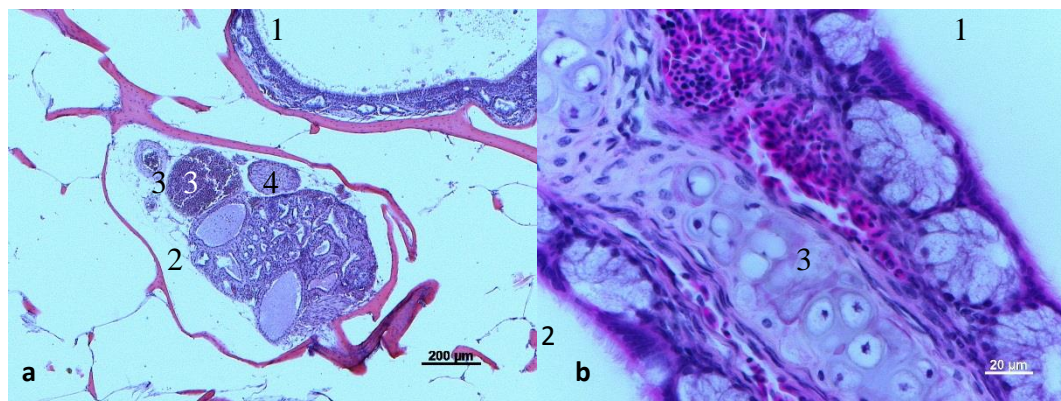


Abb. 3 a) Ziegensittich #38035, respiratorisches Epithel (1), Nasendrüse mit großlumiger Sekretfüllung (2), begleitet von einem Nerv (4) und Blutgefäßen (3), Färbung Hämatoxylin-Eosin, b) Ziegensittich #30668, respiratorisches Epithel (1) unterlagert von zahlreichen Erythrozyten an konvexer Fläche der Windung der *Concha nasalis media*, respiratorisches Epithel (2) an konkaver Seite der Windung, Hyaliner Knorpel (3), Färbung Hämatoxylin-Eosin

3.1.4. Schwarzohrpapagei (*Pionus menstruus*)

Auch beim Schwarzohrpapagei konnte neben einer ventralen auch eine zusätzliche dorsale Windung der *Concha nasalis media* beobachtet werden (Abb. 4a). Das respiratorische Epithel glich im Aufbau dem des Wellensittichs. Bei Schwarzohrpapagei #34789 stellten sich neben Venen Arterien in der *Lamina propria mucosae* dar (Abb. 4a). Die bereits beim Wellensittich beschriebenen Bestandteile des respiratorischen Epithels, und zwar muköse Drüsen, sowie hochprismatisches Flimmerepithel und *Lamina propria mucosae* mit Blutgefäßen, waren auch hier erkennbar (Abb. 4b).

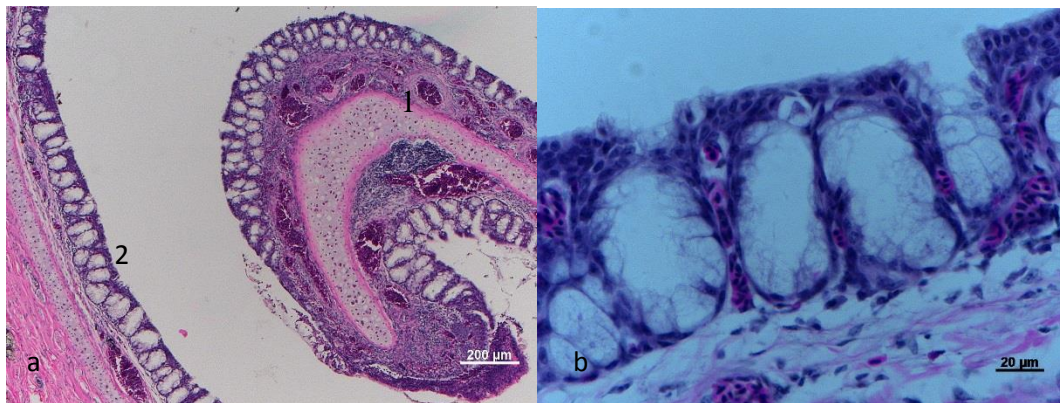


Abb. 4 a) Schwarzohrpapagei #34789, respiratorisches Epithel, Randbereich der *Concha nasalis media*, unterlagert von Venenplexus und zwei Arterien (1), hochgradig mit Erythrozyten gefüllt, gegenüber Auskleidung der Nasenhöhle (2), Färbung Hämatoxylin-Eosin, b) zahlreiche intraepitheliale muköse Drüsen sitzen teilweise der Basallamina auf, diese ist unterlagert und etwas abgelöst von *Lamina propria mucosae*, darin ein kleines mit Erythrozyten gefülltes Blutgefäß, Färbung Hämatoxylin-Eosin

3.1.5. Kongo-Graupapagei (*Psittacus erithacus*)

Bei den in dieser Studie einbezogenen Kongo-Graupapageien wurde das *Vestibulum nasi*, also der Bereich direkt hinter den Nasenlöchern, mit Präparaten erfasst. Hier konnte ein mehrschichtiges, verhorntes Plattenepithel dargestellt werden (Abb. 5a, b, c). Das untergelagerte Bindegewebe war derb-elastisch und stand in enger Verbindung zur Knorpelhaut. Hochprismatisches, mehrschichtiges Epithel fand sich in einer kleinen Übergangszone zum respiratorischen Epithel. Wie bei Kongo-Graupapagei #45040 dargestellt, konnte im respiratorischen Epithel eine hohe Dichte von intraepithelialen *Exocrinocyti caliciformes* (Becherzellen) und mukösen Drüsen beobachtet werden (Abb. 5a, b, c).

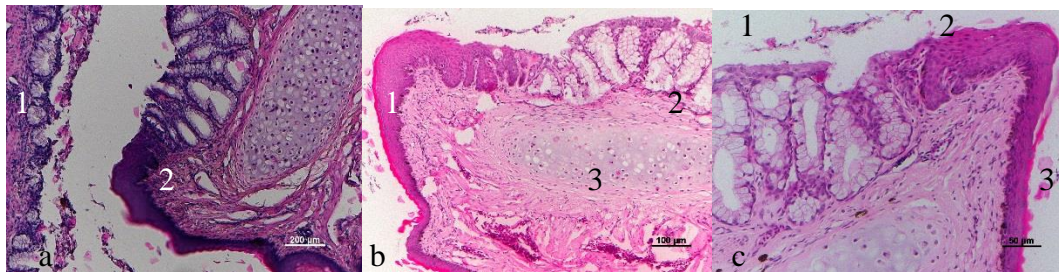


Abb. 5 a) Kongo-Graupapagei #45040 (mit nachgewiesener Bornavirus-Infektion), respiratorische Schleimhaut (1), Übergangsbereich kutane Schleimhaut (2) zu respiratorische Schleimhaut, in der Nasenhöhle Zelldebris, Färbung Hämatoxylin-Eosin, b) Übergang kutane Schleimhaut (1) in respiratorische Schleimhaut (2) auf Knorpel (3), Färbung Hämatoxylin-Eosin, c) respiratorisches Epithel mit zahlreichen mukösen Drüsen (1), mehrschichtiges, hochprismatisches Übergangsepithel (2) und mehrschichtiges, verhorntes Plattenepithel (3), Färbung Hämatoxylin-Eosin

Das respiratorische Epithel des Kongo-Graupapagei glich im Aufbau dem des Wellensittichs (Abb. 6b). Bei Kongo-Graupapagei #29823 (Abb. 6a) waren die untergelagerten Gefäße ausschließlich an der konvexen Fläche der Windung zu erkennen und bereits am Ende der Schnecke kaum noch vorhanden. Bei den intraepithelialen mukösen Drüsen von Kongo-Graupapagei #45040 war im dargestellten Ausschnitt keine Öffnung ins Lumen der Nasenhöhle erkennbar, sie schienen hier vollständig mit hochprismatischen Epithelzellen bedeckt (Abb. 6c).



Abb. 6 a) Kongo-Graupapagei #29823, respiratorisches Epithel an der Windung der *Concha nasalis media*, unterlagert mit Blutgefäßen, keine starke Füllung von Kapillaren mit Erythrozyten erkennbar, Färbung Hämatoxylin-Eosin, b) respiratorisches Epithel mit zahlreichen mukösen Drüsen, aufgelagert auf den Knorpel der *Concha nasalis media*, Färbung Hämatoxylin-Eosin, c) Kongo-Graupapagei #45040 (mit nachgewiesener Bornavirus-Infektion), respiratorisches Epithel mit eingelagerten mukösen Drüsen, unterlagert von *Lamina propria mucosae*, Färbung Hämatoxylin-Eosin

Als Detektor für Bornavirusnukleoprotein wurde in der Immunhistochemie ein polyklonaler Anti-PaBV-N-Antikörper verwendet. Eine Bindung an Bornavirus-N-Protein wurde mit einer braunen Farbreaktion sichtbar gemacht. N-Protein ließ sich in der Regel im Zellkern, aber häufig auch im Zytoplasma infizierter Zellen nachweisen. Als Gegenfärbung wurde Hämalun verwendet, welches bei nicht-infizierten Zellen oder in den Fällen, in denen die Menge des N-Proteins unter der Nachweisgrenze lag und daher keine braune Färbung festgestellt werden konnte, als blauer Kernfarbstoff erkennbar war.

Bei Kongo-Graupapagei #38763, der mit PaBV-2 infiziert war, ließ sich in der kompletten Auskleidung der Nasenhöhle eine Bindung des Antikörpers in allen Schichten des Epithels nachweisen (Abb. 7a, b). Die hochprismatischen Epithelzellen mit den Kinozilien, die Basalzellen, die Endothelzellen der Blutgefäßwände und auch Fibrozyten in der *Lamina propria mucosae* sowie die mukösen Drüsenzellen reagierten positiv für N-Antigen. Die antigenspezifische Färbung war hauptsächlich im Zytoplasma der Zellen zu finden, es waren aber auch zahlreiche Zellkerne betroffen. Zudem reagierten vereinzelte Kerne der Chondrozyten im hyalinen Knorpel Antigen-positiv. Bei dem in der konventionellen PCR positiv auf Bornaviren getesteten Kongo-Graupapagei #37929, der ebenfalls mit PaBV-2 infiziert war, wurden eine Farbreaktion in der Immunhistochemie nur in einzelnen hochprismatischen Epithelzellen und den

Kinozilien des respiratorischen Epithels festgestellt (Abb. 7c). Viele Chondrozyten im hyalinen Knorpel desselben Vogels zeigten eine intensive Färbung, dabei war deutlich häufiger das Zellplasma als der Zellkern betroffen (Abb. 7d).

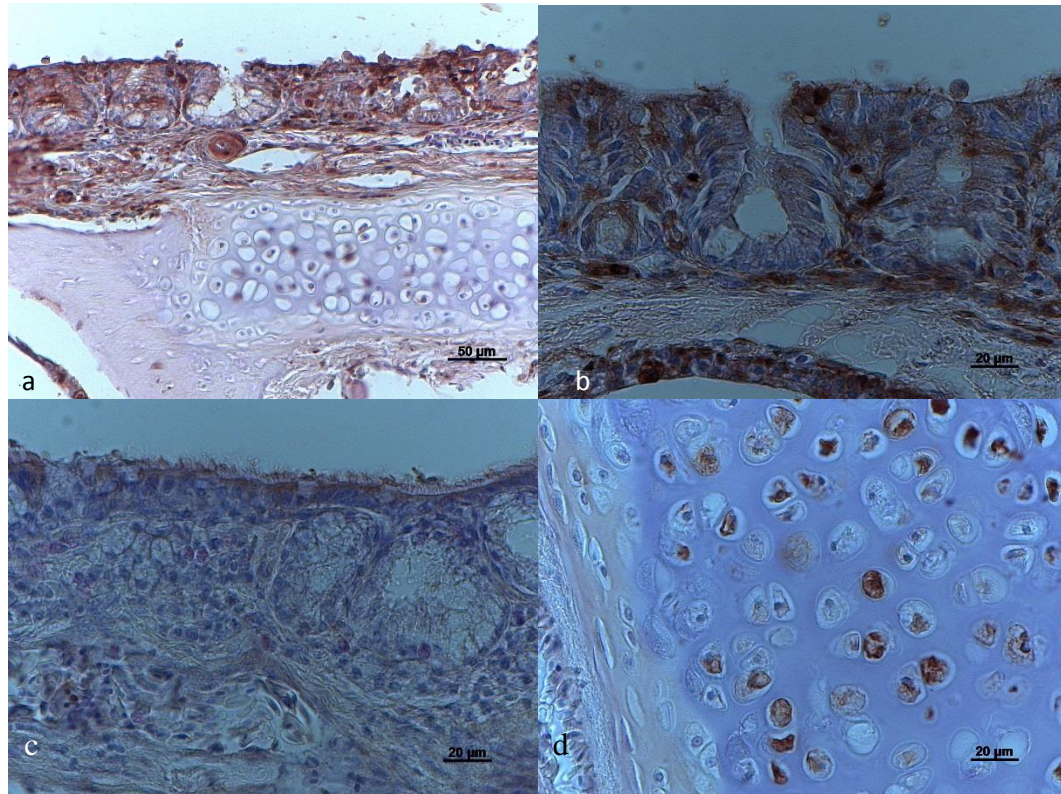


Abb. 7 a) Kongo-Graupapagei #38763 (mit nachgewiesener Bornavirus-Infektion), respiratorisches Epithel, der Kinoziliensaum ist nahezu lückenlos positiv eingefärbt, Epithelauskleidungen von Blutgefäßen der untergelagerten *Lamina propria mucosae* weisen in Zellkernen und dem Zytoplasma der Zellen eine intensive Färbung auf, ebenso einzelne Chondrozyten des hyalinen Knorpels, Färbung IHC Bornavirus, b) Kongo-Graupapagei #38763 (mit nachgewiesener Bornavirus-Infektion), stark positiv gefärbten Kernen der mukösen Drüsenzellen und der Basallamina, in vielen Zellen (Basalzellen, hochprismatische Epithelzellen, Wände der Blutgefäße) ist ausschließlich das Zytoplasma angefärbt, Färbung IHC Bornavirus, c) Kongo-Graupapagei #37929 (mit nachgewiesener Bornavirus-Infektion), respiratorisches Epithel, in wenigen Zellen eine positive Färbung dargestellt, nahezu ausschließlich im Zytoplasma, nur wenige Kerne; Kinozilien und vereinzelte hochprismatische Epithelzellen mit schwach positiver Färbung, Färbung IHC Bornavirus, d) Kongo-Graupapagei #37929 (mit nachgewiesener Bornavirus-Infektion),

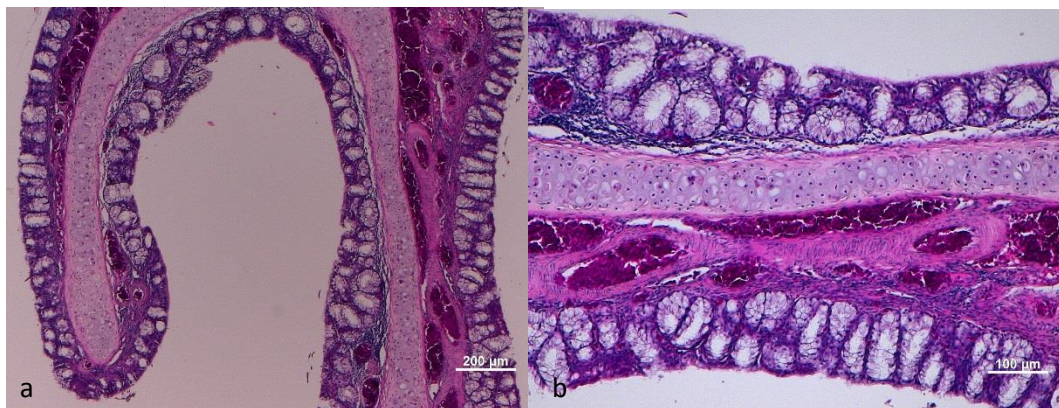
zahlreiche Chondrozyten des hyalinen Knorpels zeigen N-Protein-Färbung im Kern und im Zytoplasma, Färbung IHC Bornavirus

3.1.6. Amazonen

Blaustirn-Amazone (*Amazona aestiva*), Granada-Amazone (*Amazona rhodocorytha*), Kuba-Amazone (*Amazona leucocephala*), Venezuela-Amazone (*Amazona amazonica*)

Auch die untersuchten Amazonenarten zeigten eine beidseitige Windung der *Concha nasalis media* nach dorsal sowie auch ventral. Der Aufbau des respiratorischen Epithels glich dem beim Wellensittich. Bei den Amazonenarten wurde der Windungsbereich der *Concha nasalis media* ebenfalls größtenteils an der konvexen Fläche von zahlreichen Blutgefäßen in der *Lamina propria mucosae* unterlagert (Abb. 8a, b). Bei der Venezuela-Amazone #32270 waren diese Gefäße in der Präparation hochgradig mit Erythrozyten angefüllt. In der konkaven Fläche der Windung waren nur wenige Gefäße zu finden (Abb. 8c). Bei diesem Vogel fiel jedoch eine hohe Zahl an Lymphozyten auf (Abb. 8b, c).

Bei der Kuba-Amazone #20847, welche in der konventionellen PCR positiv auf Bornaviren getestet worden war (PaBV-2), waren neben den vollständig von hochprismatischen Epithelzellen überdeckten mukösen Drüsen und auch darunter, in der *Lamina propria mucosae*, mit Erythrozyten gefüllte Blutgefäße zu erkennen (Abb. 8d).



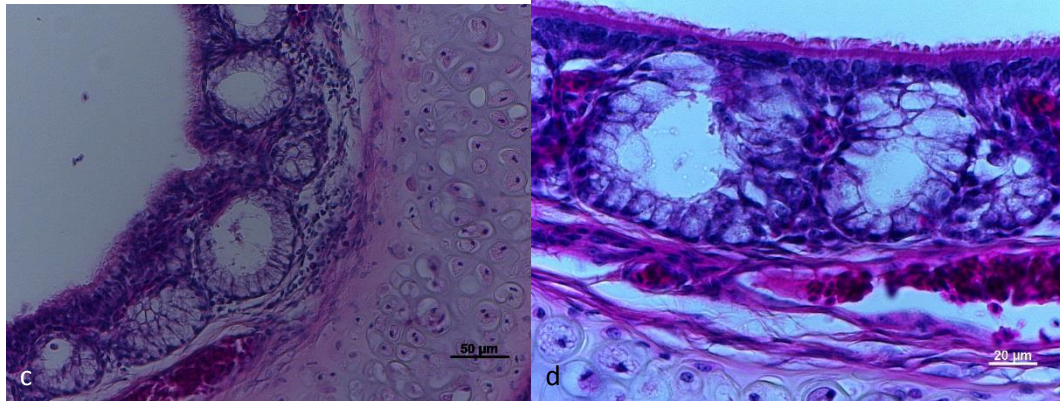


Abb. 8 a) Venezuela-Amazone #32270, respiratorisches Epithel, im Randbereich der Windung der *Concha nasalis media*, unter dem respiratorischen Epithel, sind Blutgefäße mit Erythrozyten zu erkennen, Färbung Hämatoxylin-Eosin, b) in der Detailansicht ist zu erkennen, dass die großen Blutgefäße hauptsächlich auf der konvexen Seite der *Concha nasalis media* in der *Lamina propria mucosae* eingelagert sind, bei diesem Tier auch hochgradig mit Erythrozyten gefüllt, im linken oberen Bildbereich fällt eine Ansammlung von Lymphozyten/Plasmazellen auf, Färbung Hämatoxylin-Eosin, c) Detailansicht aus dem konkaven Teil der Windung der *Concha nasalis media*, respiratorisches Epithel mit zahlreichen mukösen Drüsen und nur gering ausgeprägter *Lamina propria mucosae*, in die zahlreiche Lymphozyten/Plasmazellen eingewandert sind, auf der Basis des hyalinen Knorpels, Färbung Hämatoxylin-Eosin, d) Kuba-Amazone #20847 (mit nachgewiesener Bornavirus-Infektion), respiratorisches Epithel mit mukösen Drüsen und hochprismatischem Epithel, unterlagert von zwei Blutgefäßen (mit Erythrozyten gefüllt) in der wenig ausgeprägten *Lamina propria mucosae*, Färbung Hämatoxylin-Eosin

Bei dieser mit PaBV-2-infizierten Kuba-Amazone #20847 konnte bereits in der Übersicht des immunhistochemisch gefärbten Präparates eine starke Braunfärbung erkannt werden (Abb. 9a). Neben den hochprismatischen Epithelzellen und ihren Kinozilien waren bei diesem Vogel auch einzelne Zellen der mukösen Drüsen betroffen. Zudem wurde in den Endothelzellen, die das unterlagerte Blutgefäß auskleideten, PaBV-N-Antigen nachgewiesen. Die in Massen vorliegenden Erythrozyten waren nicht befallen (Abb. 9b). Während alle hochprismatischen Epithelzellen und ihre aufsitzenden Kinozilien im Zytoplasma positiv reagierten,

waren ihre Zellkerne nur sporadisch betroffen (Abb. 9c, d). An der konvexen Fläche der Conchenwindung konnte in der *Lamina propria mucosae* eine schwache Anfärbung bei einzelnen Fibrozyten beobachtet werden. In den Chondrozyten des hyalinen Knorpels oder den dortigen Drüsenzellen erfolgte bei diesem Tier kein Nachweis von PaBV-N-Protein.

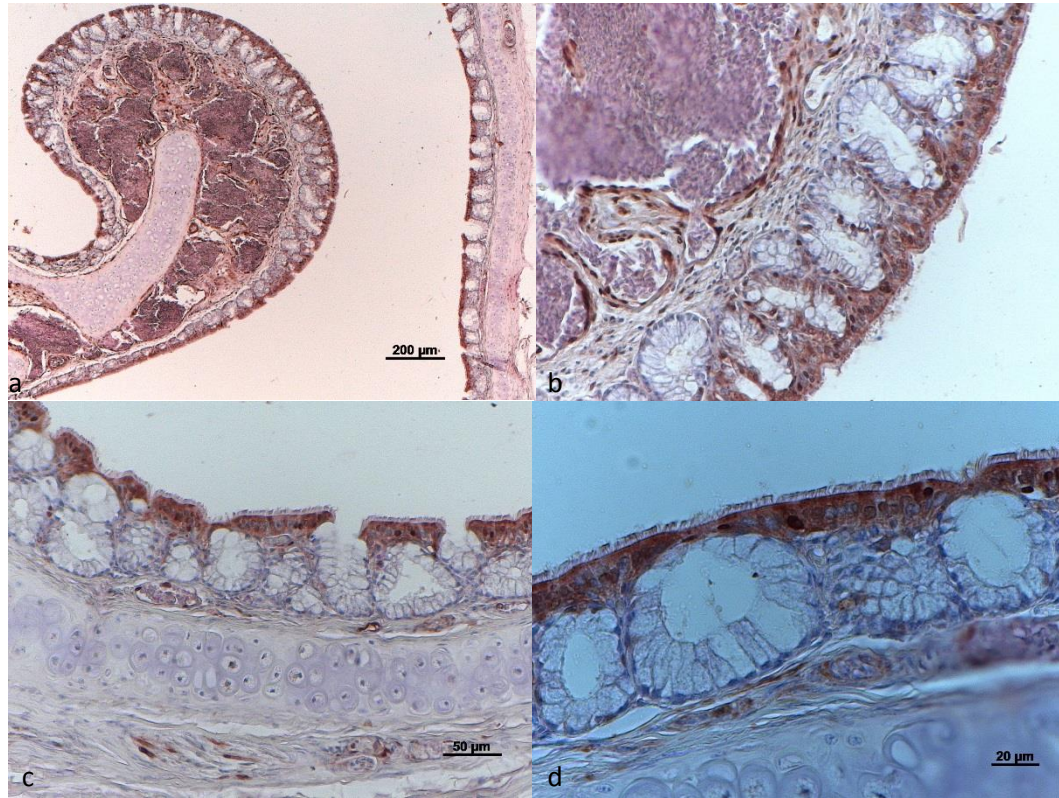


Abb. 9 a) Kuba-Amazone #20847 (mit nachgewiesener Bornavirus-Infektion), respiratorisches Epithel, Randbereich der Windung der *Concha nasalis media*, *Lamina propria mucosae* von zahlreichen großlumigen Blutgefäßen unterlagert, alle hochgradig mit Erythrozyten gefüllt, respiratorisches Epithel als Auskleidung der Nasenhöhlenwand, stark positive Anfärbung der hochprismatischen Zellen und Kinozilien, Färbung IHC Bornavirus, b) positive Anfärbung von Zellkernen und Zellplasma im Bereich der Basalmembran und der hochprismatischen Zellen, ebenfalls nur einzelne Zellen der mukösen Drüsen betroffen, Färbung IHC Bornavirus, c) im konkaven Bereich der Windung nur ganz vereinzelt positive Zellen in der Tiefe, es sind fast ausschließlich die hochprismatischen Zellen in Zellkern und Zellplasma betroffen, im hyaline Knorpel ist kein Nachweis von Bornaviren möglich, Färbung IHC Bornavirus, d) Ausschnittsvergrößerung aus c) nur

vereinzelte Zellkerne (im Bildausschnitt sieben Zellkerne) mit N-Protein positiver Reaktion, bei den anderen hochprismatischen Zellen ist ausschließlich das Zellplasma betroffen, Färbung IHC Bornavirus

Bei der immunhistochemischen Untersuchung der ebenfalls mit PaBV-infizierten Granada-Amazone #27144, hier war allerdings PaBV-4 nachgewiesen worden, zeigten sich vergleichbare Befunde zu Kuba-Amazone #20847. Auch bei diesem Vogel war eine deutliche, flächig ausgeprägte Antigenverteilung in den hochprismatischen Epithelzellen und den Kinozilien des respiratorischen Epithels zu erkennen (Abb. 10a, b). Dabei war die Intensität der Färbung jedoch deutlich geringer ausgeprägt und es zeigte sich auch in den Erythrozyten eine Farbreaktion, so dass eine unspezifische Reaktion nicht ausgeschlossen werden konnte. Bei Granada-Amazone #27144 waren ausschließlich Zellplasma, jedoch keine Zellkerne der hochprismatischen Epithelzellen betroffen (Abb. 10c).

Bei der Blaustirn-Amazone #37676 konnte im Gewebe nur eine sehr schwache positive Reaktion auf PaBV-N-Antigen dargestellt werden, auch sie war mit PaBV-4 infiziert (Abb. 10d). In den hochprismatischen Epithelzellen färbte sich das Zellplasma gering an, die Kinozilien erschienen ohne positive Reaktion.

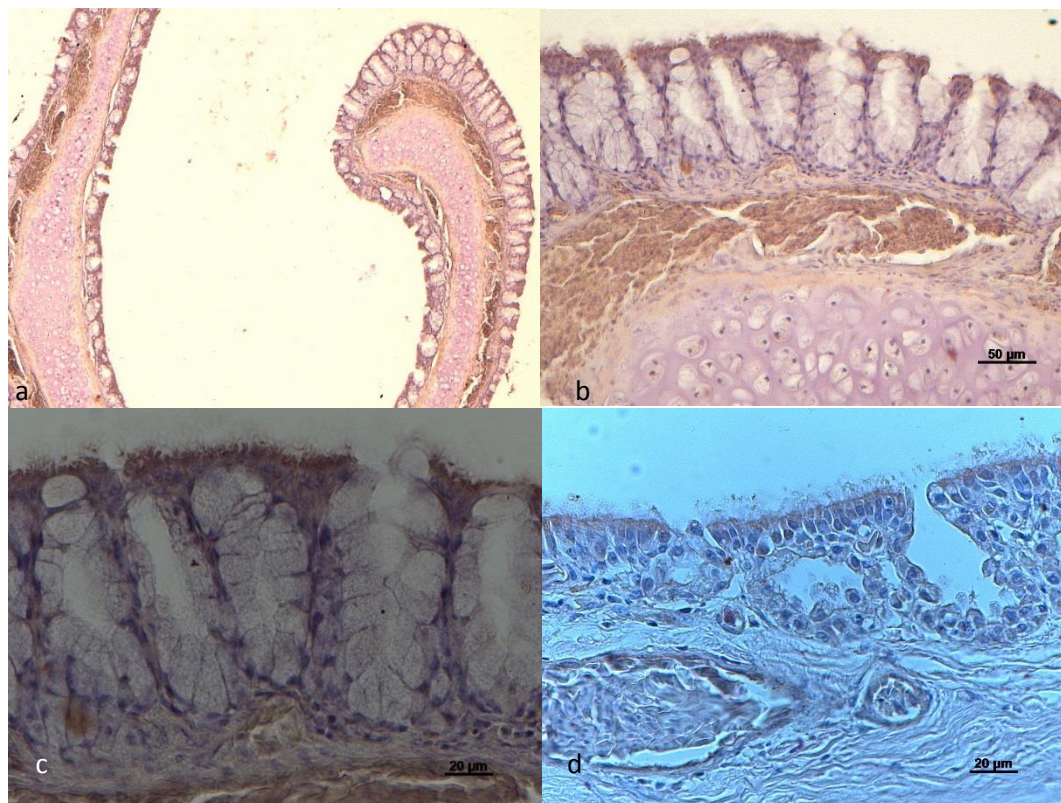


Abb. 10 a) Granada-Amazone #27144 (mit nachgewiesener Bornavirus-Infektion), respiratorisches Epithel, im Randbereich der Windung der *Concha nasalis media*, an der konvexen Seite der Windung gefüllte Blutgefäße erkennbar, Färbung IHC Bornavirus, b) hyaliner Knorpel ohne Nachweis von Bornavirus-Antigen, die Erythrozyten sind im Zellplasma braun gefärbt, im respiratorischen Epithel zeigen die hochprismatischen Zellen einschließlich Kinozilien eine schwache Färbung, Färbung IHC Bornavirus, c) bei den hochprismatischen Zellen ist eine Reaktivität im Zellplasma sichtbar, Färbung IHC Bornavirus, d) Blaustirn-Amazone #37676 (mit nachgewiesener Bornavirus-Infektion), respiratorisches Epithel, nur schwache Färbung des Zellplasmas der hochprismatischen Zellen und einzelner Kerne erkennbar, Färbung IHC Bornavirus

3.1.7. Hybridara

Bei der Untersuchung des Hybridaras #118 war die Darstellung der *Concha nasalis media* nicht möglich. Es konnte aber respiratorisches Epithel präpariert werden. Dieses glich im Aufbau dem des Wellensittichs, auch hier konnten mit Erythrozyten gefüllte Blutgefäße in der *Lamina propria mucosae* dargestellt werden (Abb. 11a, b, c). Eine Darstellung von mukösen Drüsen war aufgrund des schlechten Erhaltungszustandes des Gewebes nicht möglich. Das hochprismatische Epithel mit den aufsitzenden Kinozilien war gut erkennbar (Abb. 11c), in der *Lamina propria mucosae* konnte eine hochgradige Ansammlung von Leukozyten festgestellt werden.



Abb. 11 a) Hybridara #118 (mit nachgewiesener Bornavirus-Infektion), respiratorisches Epithel Übersicht, Färbung Hämatoxylin-Eosin, b) respiratorisches Epithel unterlagert von Blutgefäßen die mit Erythrozyten

gefüllt sind, die mukösen Drüsen sind bereits lytisch angegriffen, Färbung Hämatoxylin-Eosin, c) respiratorisches Epithel vollständig intakt, aber in der *Lamina propria mucosa* hochgradig infiltriert von zahlreichen Leukozyten, Färbung Hämatoxylin-Eosin

Bei Hybridara #118 wurde bei der immunhistochemischen Färbung auf Bornaviren kein Virusnachweis im respiratorischen Epithel erbracht, bei diesem Vogel konnte molekulargenetisch PaBV-4 nachgewiesen werden (Abb. 12).

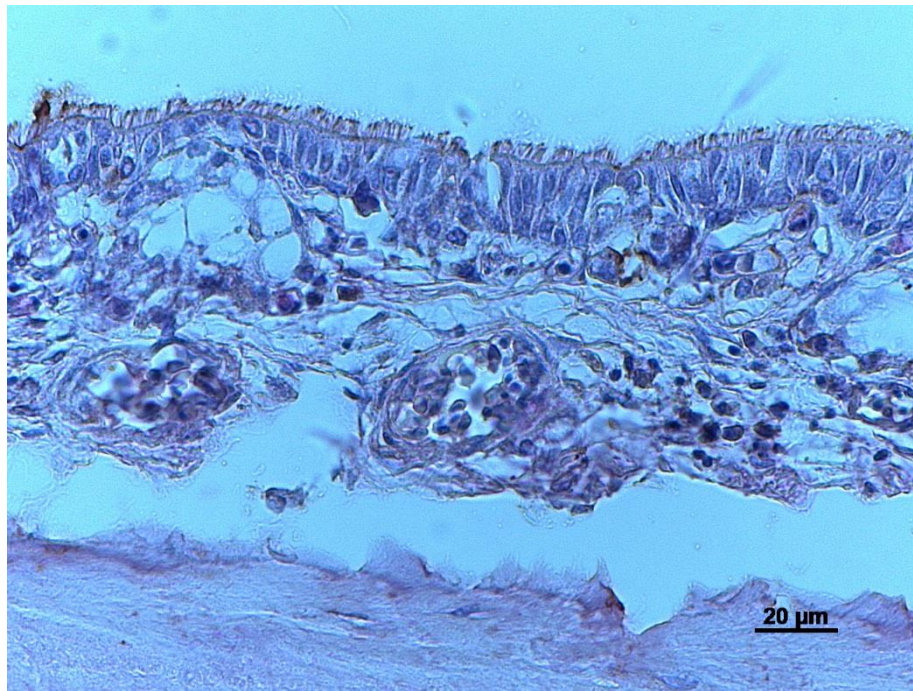


Abb. 12 Hybridara #118 (mit nachgewiesener Bornavirus-Infektion), respiratorisches Epithel, beginnende Lyse der Zellstrukturen, Ablösung vom knöchernen Untergrund, Kinozilien sind sehr schwach braun gefärbt, sonst aber kein Virusantigennachweis, Färbung IHC Bornavirus

3.1.8. Inkakakadu (*Cacatua leadbeateri*)

Bei dem einbezogenen Inkakakadu #36854 wurde wie bei den anderen Papageienvögeln dieser Studie eine beidseitige Windung der *Concha nasalis media* nach ventral und dorsal beobachtet. Der Epithelaufbau war identisch zum Wellensittich. Bei Inkakakadu #36854 war die Füllung der Blutgefäße in der *Lamina propria mucosae* so massiv, dass Rupturen erfolgt sind und die Erythrozyten teilweise frei im Gewebe lagen. Im Präparat konnte eine beginnende

Lyse und großflächige Ablösungen der Schleimhaut von den knorpeligen und knöchernen Strukturen dargestellt werden (Abb. 13a, b, c). Auf der konkaven Seite der *Concha nasalis media* saßen die mukösen Drüsen mit der Basallamina dem hyalinen Knorpel direkt auf. Den Abschluss zum Lumen der Nasenhöhle bildeten hochprismatische Epithelzellen mit Kinozilien (Abb. 13d).

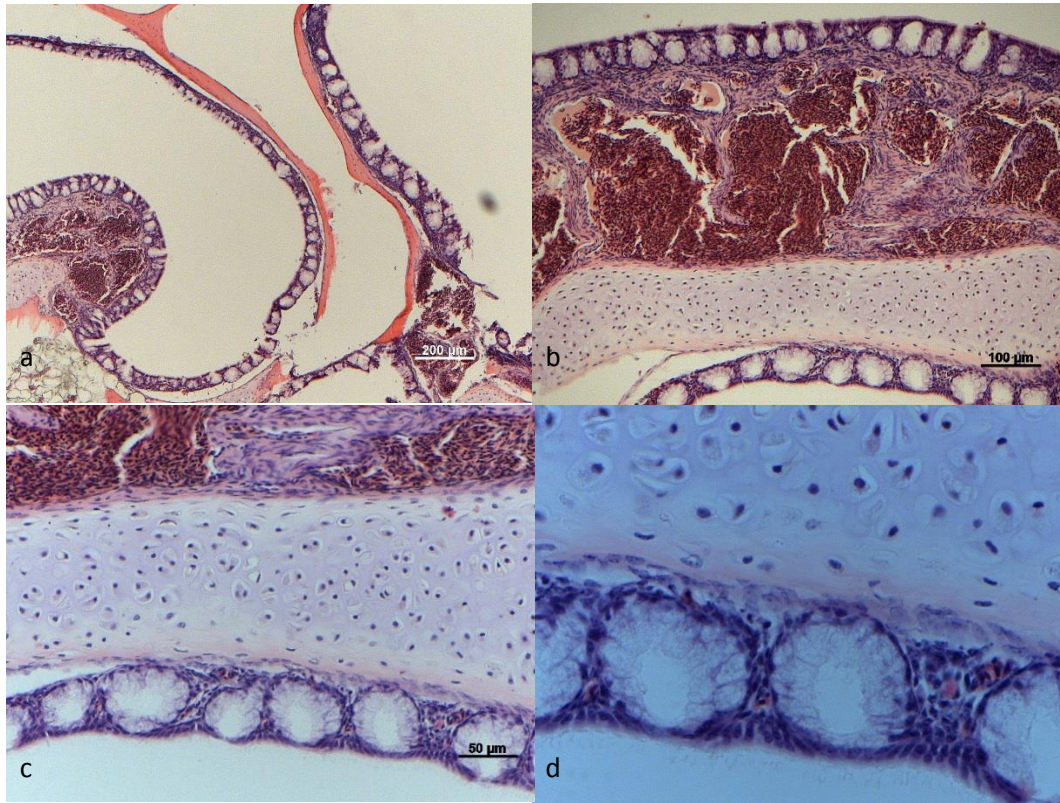


Abb. 13 a) Inkakakadu #36854, respiratorisches Epithel, im Randbereich der Windung der *Concha nasalis media*, Färbung Hämatoxylin-Eosin, b) im konvexen Bereich der Windung der *Concha nasalis media* sind dem respiratorischen Epithel großlumige Gefäße in der *Lamina propria mucosae* untergelagert, diese sind hier rupturiert und haben große Mengen an Erythrozyten freigesetzt, Färbung Hämatoxylin-Eosin, c) im konvexen Bereich der *Concha nasalis media* sind die freiliegenden Erythrozyten in der *Lamina propria mucosae* erkennbar, unterhalb des hyalinen Knorpels an der konkaven Seite der Windung ist das respiratorische Epithel mit den zahlreichen mukösen Drüsen erkennbar, links im Bild vom hyalinen Knorpel abgelöst, Färbung Hämatoxylin-Eosin, d) an der konkaven Seite der Concha-Windung, dem hyalinen Knorpel aufgelagerte Basalmembran mit

großlumigen mukösen Drüsen und aufgesetztem hochprismatischen Epithel mit Kinozilien, Färbung Hämatoxylin-Eosin

3.2. Nasendrüse (*Glandula nasalis*)

Die Nasendrüse (*Glandula nasalis*) der Vögel ist paarig angelegt und war bei allen untersuchten Papageienvögeln dieser Studie in der orbitalen Lage platziert, sie konnten also dem Typ II nach Technau (1936) zugeordnet werden. Bei den hier einbezogenen Papageienvögeln stellte sie sich als eine exoepitheliale, tubuloazinäre merokrine Drüse dar, die ein seröses Sekret abgibt. Begleitet wird sie in den untersuchten Präparaten stets von kleinen Blutgefäßen und einem Nerven, bei dem es sich vermutlich um der *Nervus ethmoidalis* handelt, der ursprünglich aus dem *Nervus ophthalmicus* (V1) bzw. dem *Nervus trigeminus* (V) entspringt (Nickel *et al.*, 1973).

3.2.1. Wellensittich (*Melopsittacus undulatus*)

Eine Nasendrüse konnte bei den in die Studie miteinbezogenen Wellensittichen nicht dargestellt werden. Da jedoch zu erwarten ist, dass sie auch bei dieser Vogelart vorhanden ist, ist zu vermuten, dass sie aufgrund ihrer geringen Größe beim technischen Prozess des Präparierens verloren gegangen ist.

3.2.2. Nymphensittich (*Nymphicus hollandicus*)

Beim Nymphensittich konnte die Nasendrüse mit den begleitenden Strukturen dargestellt werden (Abb. 14). Bei Vogel #36539 waren die Drüsenzellen dicht gepackt. Die Ausführungsgänge der tubulo-azinären Drüse wurden von einer Lage großkerniger Zylinderzellen mit basal liegenden Kernen ausgekleidet, diese waren umschlossen von einer Schicht kleiner, dicht gedrängter Zellen. Becherzellen waren nicht zu sehen. Die Lumen der Ausführungsgänge waren bei diesem Vogel kaum oder gar nicht mit Sekret gefüllt. Die begleitenden Blutgefäße waren hochgradig

mit Erythrozyten angefüllt. Der benachbarte Nerv ist in Abb. 14 oben links erkennbar. Alle anatomischen Strukturen der Nasendrüse wurden von Fettgewebe umhüllt.

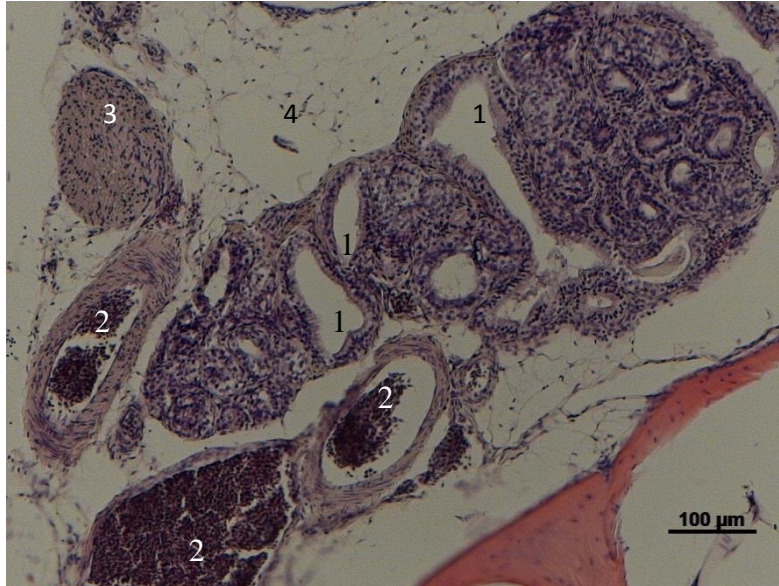


Abb. 14, Nymphensittich #36539, Nasendrüse mit dichtgepackten Drüsenzellen, großflächiger Anschnitt von Ausführungsgängen (1), begleitet von Blutgefäßen (2) die teilweise hochgradig mit Erythrozyten gefüllt sind, und einem Nerven (3), eingebettet in Fettgewebe (4), Färbung Hämatoxylin-Eosin

3.2.3. Ziegensittich (*Cyanoramphus novaezelandiae*)

Bei Ziegensittich #38035 waren die Ausführungsgänge ebenfalls mit großkernigen Zylinderzellen ausgekleidet, allerdings anders als beim Nymphensittich lagen die Zellkerne hier apikal statt basal (Abb. 15a, b). Da jedoch im Präparat bereits eine beginnende Lyse der Strukturen erkennbar war und sich ganze Auskleidungen von Ausführungsgängen aus dem Verband gelöst hatten, ist von einer Veränderung durch Autolyse auszugehen. Im Lumen der Tubuli und Ausführungsgänge war bei diesem Vogel eine hochgradige Füllung mit Sekret zu erkennen, das aus Zelltrümmern und degenerierten Zellen, die sich aus dem Zellverband gelöst hatten, bestand.

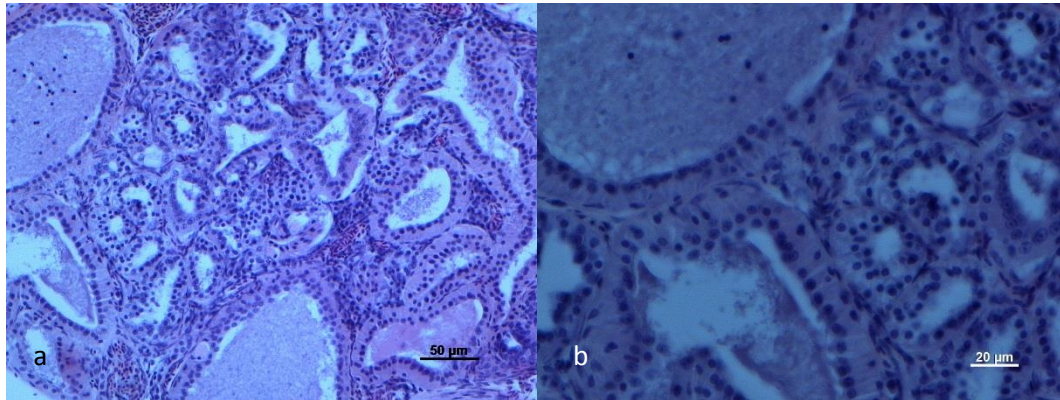


Abb. 15 a) Ziegensittich #38035, Nasendrüse, das Lumen der Ausführungsgänge an mehreren Stellen mit zellulärem Debris gefüllt, in beginnender Lyse mit Auflösung der Zellstrukturen, Färbung Hämatoxylin-Eosin, b) Vergrößerung der Ausführungsgänge (Lumen mit Debris gefüllt) und serösen Endstücke, es ist eine Auflösung der Zellen durch Lyse erkennbar, Färbung Hämatoxylin-Eosin

3.2.4. Schwarzohrpapagei (*Pionus menstruus*)

Die Nasendrüse des Schwarzohrpapageies #34789 konnte nur ohne begleitende Strukturen dargestellt werden, sie zeigte sich hier umgeben von freiliegenden Erythrozyten. Auch hier hatte eine Autolyse-bedingte Auflösung der Strukturen bereits begonnen. Die Ausführungsgänge und Tubuli waren größtenteils mit Sekret gefüllt, die Zellkerne lagen hier wie bei dem Ziegensittich #38053 apikal (Abb. 16a, b).

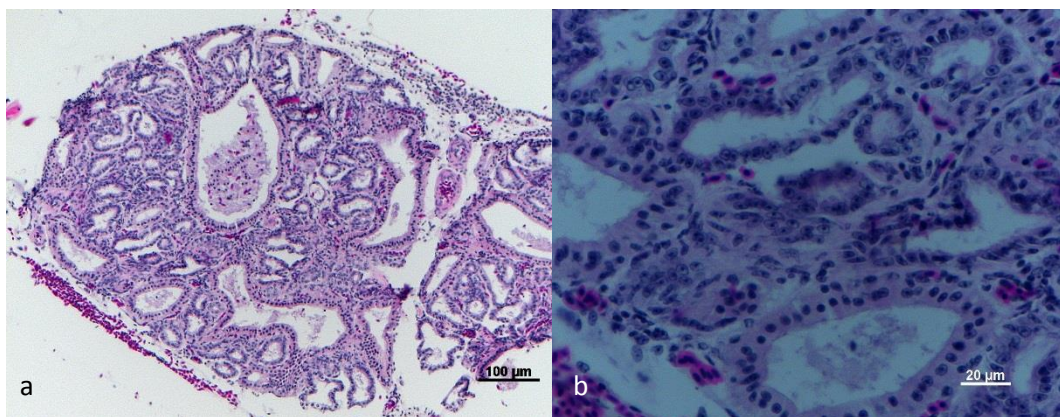


Abb. 16 a) Schwarzohrpapagei #34789, Nasendrüse, Lumina mit zellulärem Debris gefüllt, keine Umgebungsstrukturen erhalten, unten links im Bild freiliegende Erythrozyten, Färbung Hämatoxylin-Eosin, b) seröse Endstücke und Ausführungsgänge, teilweise in beginnender Lyse, mit fehlendem Lumen und aufgelösten Zellstrukturen, Färbung Hämatoxylin-Eosin

3.2.5. Kongo-Graupapagei (*Psittacus erithacus*)

Bei den Kongo-Graupapageien wurde die Nasendrüse wie bei Nymphensittich #36539 in Begleitung von Blutgefäßen und einem Nerv aufgefunden. Bei Kongo-Graupapagei #29823 war oben rechts im Bild der Anschnitt einer Blutgefäßwand zu erkennen (Abb. 17a). Bei Kongo-Graupapagei #38763 waren bindegewebige Septen zu sehen (Abb. 17b). Der in der konventionellen und der real-time-PCR positiv auf PaBV-4 getestete Kongo-Graupapagei #34349 wies lysebedingte Veränderungen der Nasendrüse auf. Wie in Abb. 17c unten links erkennbar war, hatte sich das Auskleidungsepithel des Tubulus bereits aus dem Drüsengewebe gelöst, die Zellkerne zeigten aber eine basale Lage. Eine Füllung der Lumina der Ausführungsgänge mit Sekret war nicht erkennbar (Abb. 17c).

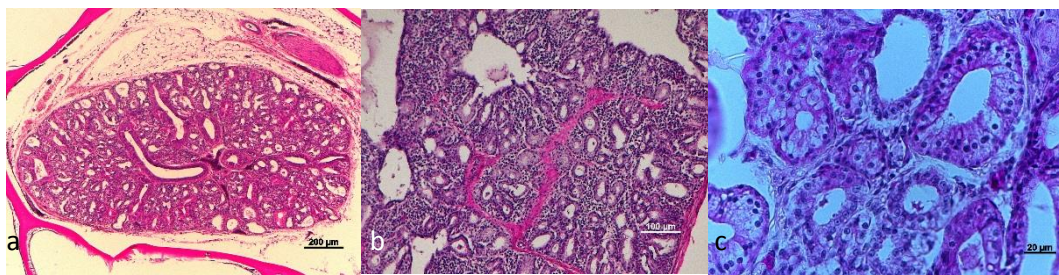


Abb. 17 a) Kongo-Graupapagei #29823, Übersichtsaufnahme der Nasendrüse, mit Blutgefäßwandanschnitt, die Nasendrüse ist eingebettet in Fettgewebe, Färbung Hämatoxylin-Eosin, b) Kongo-Graupapagei #38763, Nasendrüse, gut zu erkennen sind die zahlreichen serösen Endstücke und die großlumigen Sammelrohre dazwischen, nur wenig mit Sekret gefüllt. Die Drüse ist durchzogen von Bindegewebssträngen, Färbung Hämatoxylin-Eosin, c) Kongo-Graupapagei #34349 (mit nachgewiesener Bornavirus-Infektion), Nasendrüse, seröse Endstücke, beginnende Lyse links unten erkennbar, es löst

sich ein seröses Endstück aus dem Interstitium des Drüsenverbandes, Färbung Hämatoxylin-Eosin

In der immunhistochemischen Färbung konnte in der Nasendrüse von Kongo-Graupapagei #37929 PaBV-N-Antigen nachgewiesen werden. Hier waren die auskleidenden Epithelien einzelner seröser Endstücke betroffen, eine Färbung war primär im Zellplasma und nur gelegentlich im Kern der Epithelzellen feststellbar (Abb. 18a, b). Dieser Vogel war mit PaBV-2 infiziert.

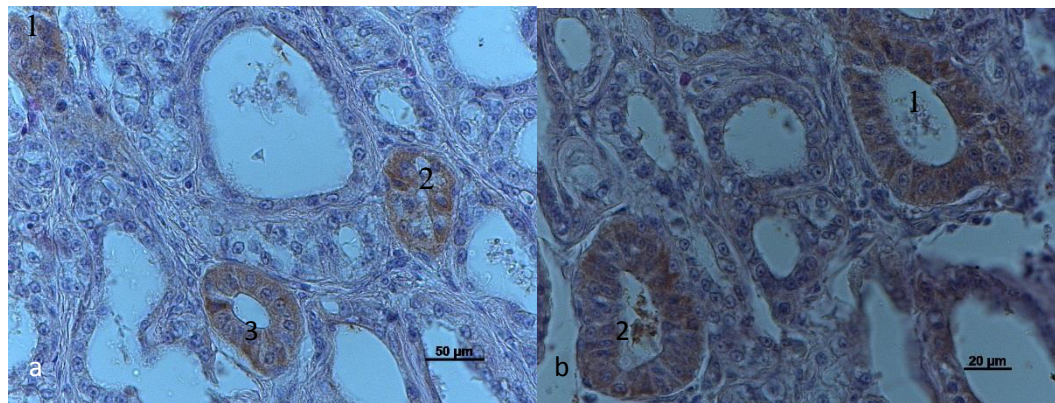


Abb. 18 a) Kongo-Graupapagei #37929 (nachgewiesene Bornavirus-Infektion), Nasendrüse, Anfärbung des Zytoplasmas der Epithelzellen von drei serösen Endstücken (1-3), Färbung IHC Bornavirus, b) positive Färbung von zwei Endstücken (1-2), hauptsächlich im Zytoplasma, aber auch in zwei Zellkernen, im umgebenden Drüsengewebe vereinzelt positive Zellkerne mit Virusnachweis, Färbung IHC Bornavirus

3.2.6. Amazonen

Venezuela-Amazone (*Amazona amazonica*), Blaustirn-Amazone (*Amazona aestiva*)

Bei der Venezuela-Amazone #32270 konnte die Nasendrüse mit allen umgebenden Strukturen, also mit Blutgefäßen und Nerven, dargestellt werden (Abb. 19a). Die begleitenden Blutgefäße waren hier hochgradig mit Erythrozyten gefüllt, auch freiliegende Erythrozyten waren vorhanden. In keinem der zahlreichen Anschnitte der Ausführungsgänge war eine Füllung mit Sekret zu erkennen (Abb. 19b).

Bei der infolge einer Bornavirus-Infektion erkrankten Blaustirn-Amazone #18784 waren neben einem großlumigen Ausführungsgang zahlreiche Tubuli angeschnitten, bei denen ebenfalls keine Sekretfüllung dargestellt werden konnte (Abb. 19c).

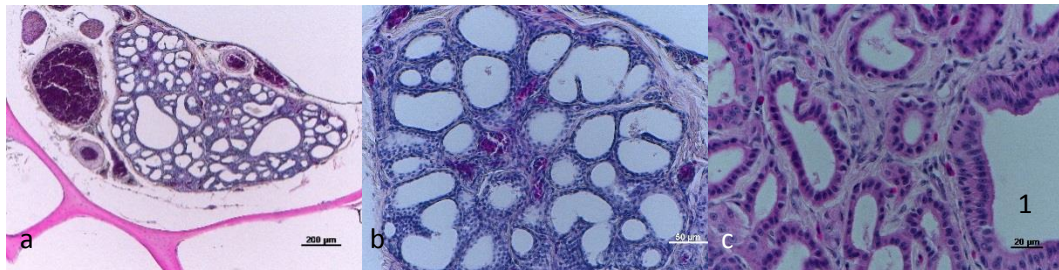


Abb. 19 a) Venezuela-Amazone #32270, Nasendrüse, begleitet von Nerven und Blutgefäßen, die hochgradig mit Erythrozyten gefüllt sind, eingebettet in Fettgewebe, Färbung Hämatoxylin-Eosin, b) Venezuela-Amazone #32270, Nasendrüse, Detail mit Sammelrohren ohne Sekret in den Lumina enthalten, Färbung Hämatoxylin-Eosin, c) Blaustirn-Amazone #18784 (nachgewiesene Bornavirus-Infektion), Nasendrüse, Anschnitt Tubuli, ein größeres Sammelrohr (1), Färbung Hämatoxylin-Eosin

Bei der immunhistochemischen Färbung der Nasendrüse der Blaustirn-Amazone #18784, die mit PaBV-4 infiziert war, konnte in zahlreichen Zellen PaBV-N-Protein nachgewiesen werden. In der Übersicht war zu erkennen, dass an einigen Stellen sehr viele Zellen betroffen waren (Abb. 20a). Während der begleitende Nerv keine positive Färbung aufwies, war jedoch das Endothel der benachbarten Vene stark gefärbt. Im Drüsenkörper selbst konnte in verschiedenen Zelltypen Antigen nachgewiesen werden. Hierbei waren sowohl Zellkerne als auch Zellplasma betroffen, entweder beide zusammen in einer Zelle, oder auch nur eine Komponente. Sowohl großkernige Zylinderzellen der Ausführungsgänge, als auch einzelne Zellen der serösen Endstücke und Zellen des Drüsenkörpers waren betroffen (Abb. 20b, c). Anders als bei dem Kongo-Graupapagei #37929, der mit PaBV-2 infiziert war, waren hier aber nicht alle Zellen der Sammelrohre gleichermaßen betroffen. Bei Blaustirn-Amazone #37676 konnte trotz positivem Befund in der konventionellen und real-time-PCR und dem Nachweis von PaBV-4 in anderen Organen kein Virusantigennachweis mit der immunhistochemischen Färbung erbracht werden, allerdings sind Leukozyten-/Plasmazellenansammlungen erkennbar (Abb. 20d).

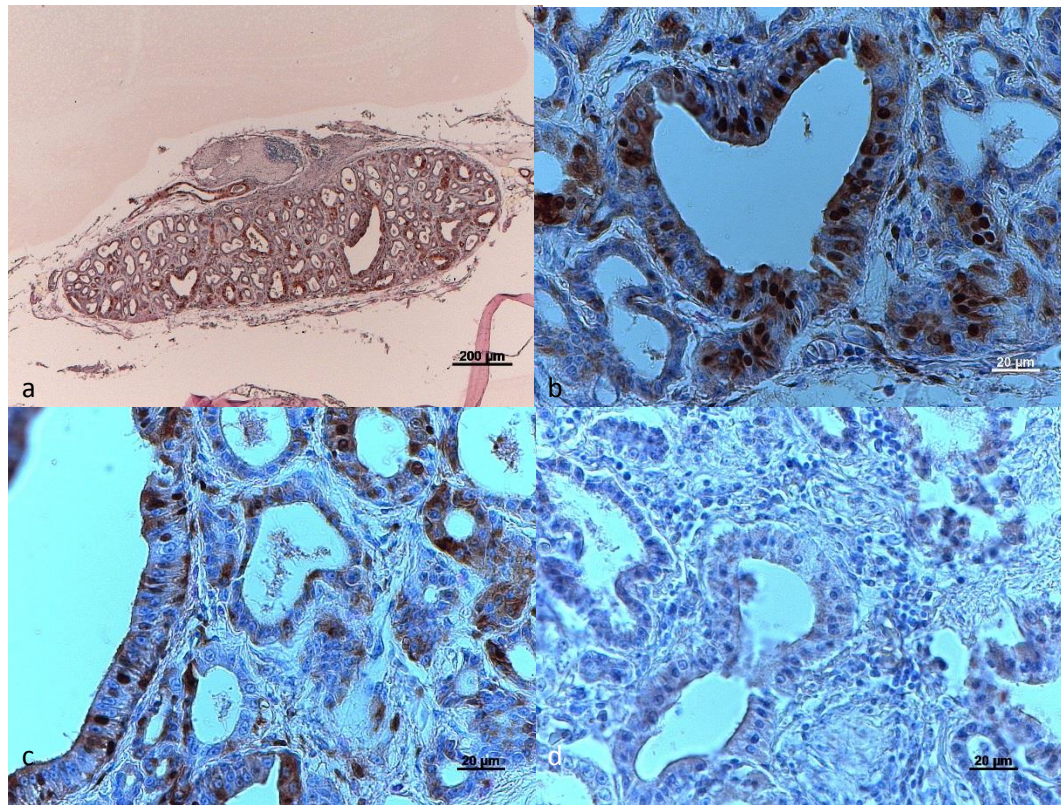


Abb. 20 a) Blaustirn-Amazone #18784 (mit nachgewiesener Bornavirus-Infektion), Nasendrüse, Überblick, begleitet von einem Nerven, eingebettet in Fettgewebe, Färbung IHC Bornavirus, b) und c) hochgradiger, diffuser Befall von Zellkernen und auch Zellplasma (sowohl kombiniert als auch einzeln) von Zellen der serösen Endstücke und Sammelrohre. In den Endstücken und Tubuli sind auch nicht reaktive Zellen zu erkennen, Färbung IHC Bornavirus, d) Blaustirn-Amazone #37676 (mit nachgewiesener Bornavirus-Infektion), Nasendrüse, kein Befall mit Bornavirus in der IHC nachweisbar, Leukozytenansammlungen im Drüseninterstitium, Färbung IHC Bornavirus

3.2.7. Aras

Hahns Zwergara/ Blaustirn-Zwergara (*Diopsittaca nobilis*), Hybridara

Bei Zwergara #34664 konnte die Nasendrüse in Begleitung von Blutgefäßen und Nerven dargestellt werden. Die großlumigen Ausführungsgänge der Drüse waren nicht mit Sekret gefüllt und auch hier waren bindegewebige Septen zu erkennen,

die den Drüsenkörper durchzogen (Abb. 21a, b). Die Tubuli der Endstücke zeigten größtenteils basal ausgerichtete Zellkerne (Abb. 21c).

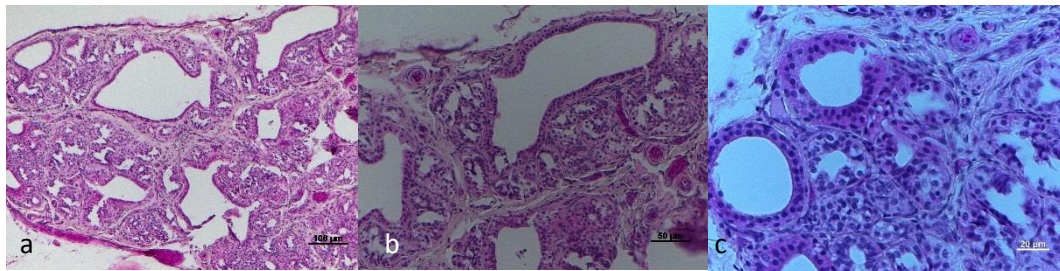


Abb. 21 a) Zwerggare #34664, Nasendrüse, Übersicht, Färbung Hämatoxylin-Eosin, b) großlumige Sammelrohre, kein Sekret im Lumen, durchzogen von bindegewebigen Septen, Färbung Hämatoxylin-Eosin, c) Anschnitt von Ausführungsgängen und serösen Endstücken, kein Sekret im Lumen, Färbung Hämatoxylin-Eosin

Der Hybridara #118, bei dem eine Infektion mit PaBV-4 nachgewiesen worden war, zeigte in der Nasendrüse autolytische Veränderungen des Gewebes (Abb. 22a). Die Epithelien der serösen Endstücke und Ausführungsgänge hatten sich teilweise aus dem Drüsenkörper gelöst, Zellen hatten ihre Zellkerne freigegeben. Der Drüsenkörper wies hier einen großen Anteil von Bindegewebe auf. In der immunhistochemischen Borna-Färbung erfolgte nur ein sehr geringer Antigennachweis (im Bildausschnitt eine einzelne befallene Zelle) (Abb. 22b).

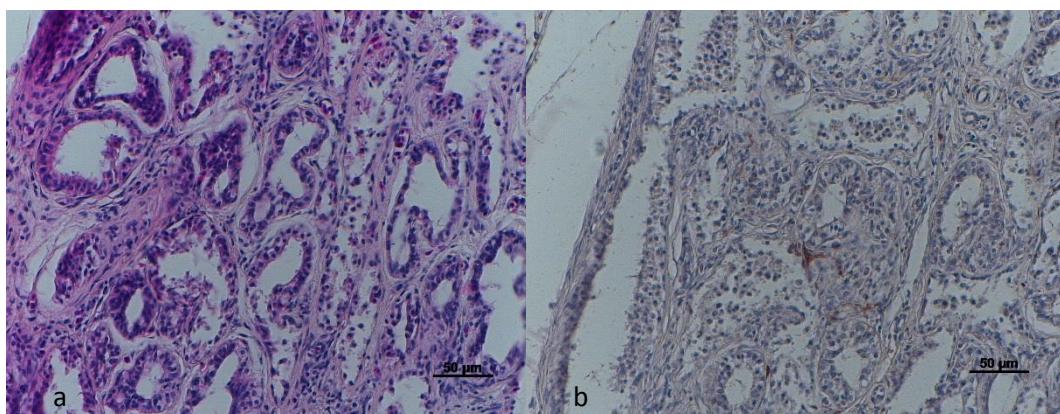


Abb. 22 a) Hybridara #118 (mit nachgewiesener Bornavirus-Infektion), Nasendrüse, einige der serösen Endstücke und Ausführungsgänge haben sich lysebedingt bereits vom umgebenden Drüsengewebe gelöst und sind teilweise kollabiert, Zellkerne wurden freigesetzt, auch das Drüsengewebe weist bereits autolytische Hohlräume auf, Färbung Hämatoxylin-Eosin, b) zentral eine

positiv angefärbte Zelle, restliches Gewebe ohne Bornavirusnachweis, Gewebe in Lyse, Strukturen gelöst, Färbung IHC Bornavirus

3.2.8. Inkakakadu (*Cacatua leadbeateri*)

Auch bei dem Inkakakadu #36854 wurde die Nasendrüse von einem Nerv und Blutgefäßen begleitet. In Abb. 23a ist der Nerv nicht mit abgebildet. Vor allem in den größeren Ausführungsgängen konnte Sekret festgestellt werden. In den serösen Endstücken und den Ausführungsgängen lagen die Zellkerne der Epithelzellen basal (Abb. 23b). Auch hier zogen bindegewebige Septen durch den Drüsenkörper und es waren kleine Gefäße erkennbar, die mit Erythrozyten gefüllt waren.

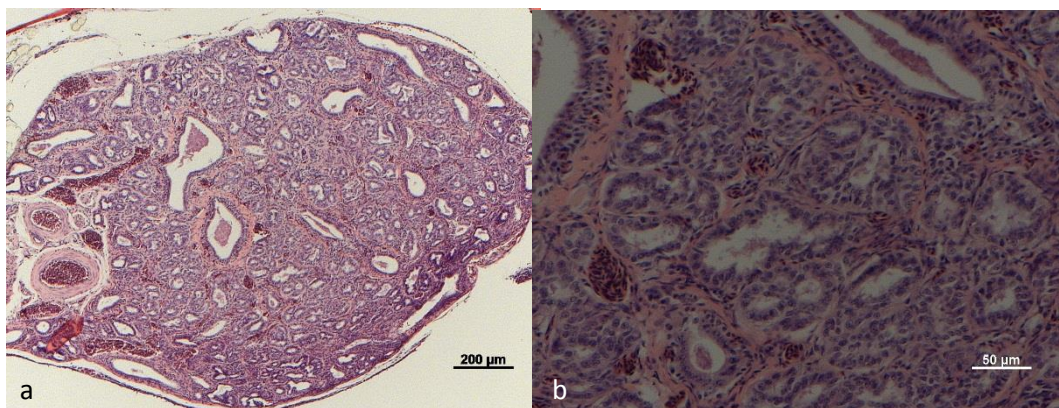


Abb. 23 a) Inkakakadu #36854, Nasendrüse, Übersicht, begleitende Blutgefäße an der linken Bildseite, die großlumigen Sammelgänge sind teilweise mit Sekret gefüllt, Färbung Hämatoxylin-Eosin, b) Anschnitt von zahlreichen serösen Endstücken, dazwischen vereinzelt Gefäße deren Lumen hochgradig mit Erythrozyten gefüllt sind, durchzogen von bindegewebigen Septen, Färbung Hämatoxylin-Eosin

3.3. Riechepithel (*Regio olfactoria*)

Bei Vögeln spielt der Geruchssinn keine sehr große Rolle, dementsprechend umfasst die Riechschleimhaut ein relativ kleines Areal, das sich auf die *Concha nasalis caudalis* und den hinteren Teil des *Septum nasi* erstreckt (Frewein & Sinowatz,

2004; König *et al.*, 2016; Liebich & Zengerling, 2010). In dieser Arbeit erfolgte das Aufsuchen im Serienschnitt am sagittal geschnittenen Kopf mit der Schnittführung von medial nach lateral. Das mehrreihige Epithel der Riechschleimhaut setzt sich aus den folgenden Komponenten zusammen: Basalzellen, Stützzellen und Sinneszellen (Riechzellen, *Epitheliocyti neurosensorii olfactorii*). Auf dem apikalen Teil der Riechzellen sitzen Zilien, sogenannte Riechhärchen. Das Axon der bipolaren Riechzellen als 1. Neuron der Riechleitung zieht durch die Basalmembran. Dahinter vereinigt es sich mit benachbarten Axonen zu den *Nervi olfactori* (Sinowatz & Rodler, 2011). In der *Lamina propria* unter dem Epithel der Riechschleimhaut sitzen die *Glandulae olfactoriae* im lockeren Bindegewebe.

Bei Nymphensittich #36539 konnten die Bestandteile des olfaktorischen Epithels im Bereich des Austritts der *Nervus olfactorius* in die Nasenhöhle dargestellt werden (Abb. 24). Nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung war die Unterscheidung von Sinneszellen und Stützzellen nur anhand der Lokalisation und der Morphologie der Kerne möglich. Die Kerne der Sinneszellen waren sehr groß und lagen mittig in der Zelle. Bei den Stützzellen waren die Kerne eher länglich und nach apikal verschoben. Die Basalzellen hingegen ließen sich durch ihre basal positionierten Kerne gut differenzieren. Auch die *Glandulae olfactoriae* waren gut zu erkennen. Des Weiteren dominierten zwei nichtmyelinisierte Nervenfasern das Präparat. Die Abhebung vom unterlagerten Knochen war präparationsbedingt.

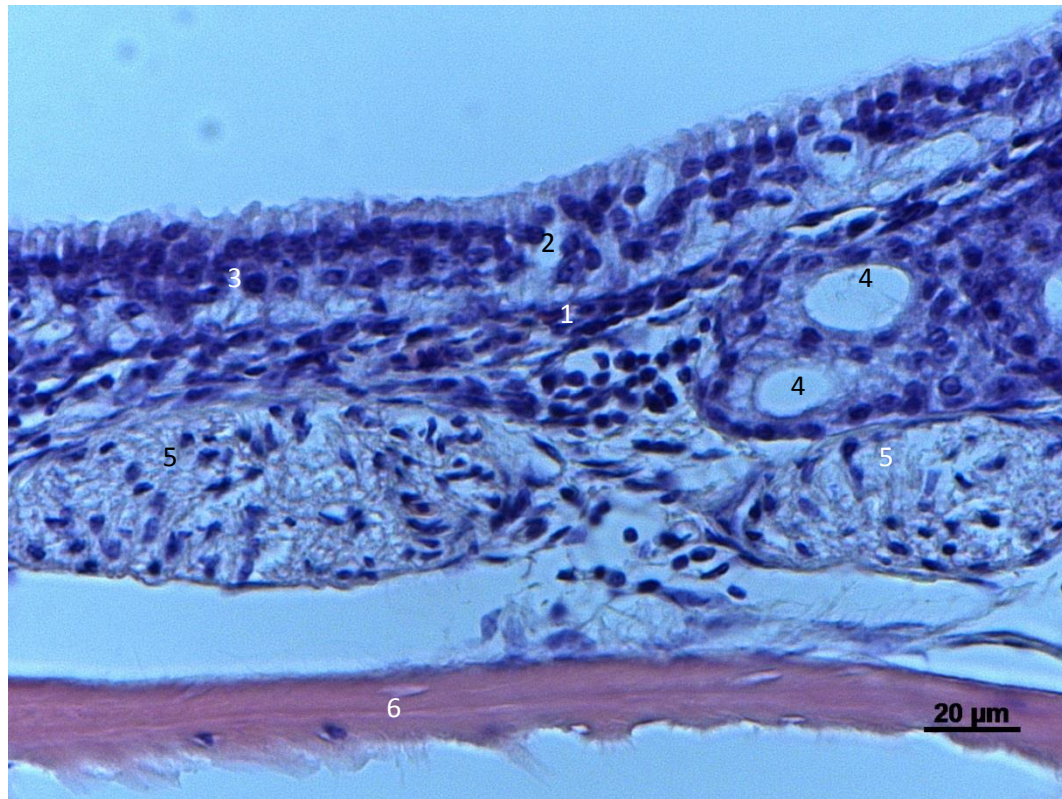


Abb. 24 Nymphensittich #36539, olfaktorisches Epithel, Basalzellen (1), Stützzellen (2), rechts zwei benachbarte Sinneszellen (3), *Glandulae olfactoriae* (4), nichtmyelinisierte Nervenfasern des Riechnerven (5), Knochenlamelle (6), Färbung Hämatoxylin-Eosin

Bei Schwarzohrpapagei #34789 konnte ein größerer Abschnitt des *Nervus olfactorius* im Präparat dargestellt werden. Das Blutgefäß, das sich unten rechts im Bild befand, markierte bereits den Bereich des respiratorischen Epithels (Abb. 25a). Eine Unterscheidung der einzelnen *Nervi olfactori* war in dieser Färbung nicht möglich (Abb. 25b). Beim Schwarzohrpapagei #34789 waren wie beim Nymphensittich #36539 die serösen Spüldrüsen, die *Glandulae olfactoriae*, unter dem olfaktorischen Epithel in der *Lamina propria* zu erkennen (Abb. 25c). Durch den etwas verkippten Schnittwinkel sind Stützzellen und Sinneszellen nicht so gut dargestellt wie bei Nymphensittich #36539, jedoch waren auch hier beide Zelltypen zu erkennen. Nicht eindeutig zu differenzieren waren jedoch die Basalzellen (Abb. 25d).

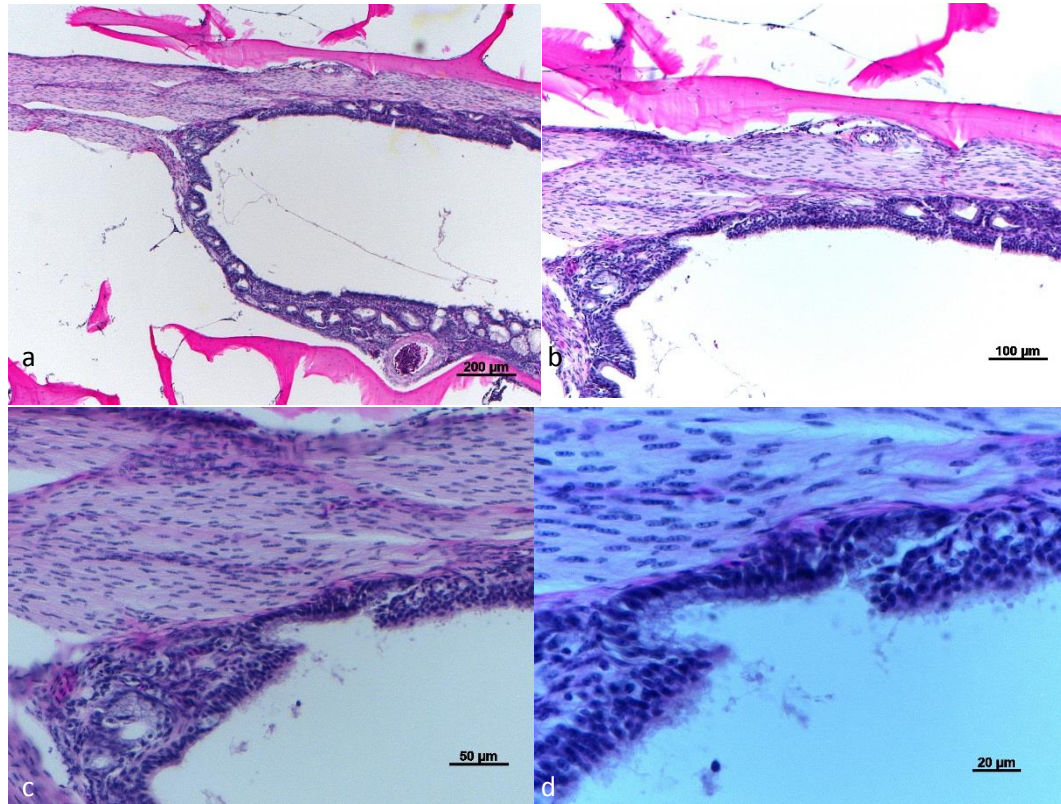


Abb. 25 a) Schwarzohrpapagei #34789, Riechnervenaustritt, zentral der Riechnerv, dessen Fasern sich auffächern und das olfaktorische Epithel unterlagern, rosa gefärbt sind die knöchernen Lamellen der Nasenhöhle, Färbung Hämatoxylin-Eosin, b) Vergrößerung des markanteren Schenkels der Riechnervenfaser, aufgelagert ist das olfaktorische Epithel und der in die *Lamina propria* eingelagerten serösen Spüldrüsen, c) unten links im Bild die *Glandulae olfactoriae* in der *Lamina propria*, d) olfaktorisches Epithel mit Sinneszellen, unterlagert von Riechnervenfaser, das rechte Teilstück des olfaktorischen Epithels ist etwas abgelöst, Färbung Hämatoxylin-Eosin

Bei Kongo-Graupapagei #38763, welcher positiv auf PaBV-2 in der konventionellen PCR getestet wurde, konnte ebenfalls der Austritt des Riechnervs in die Nasenhöhle beurteilt werden. Während der Riechnerv nach dem Austritt im Bild senkrecht nach oben führte und das olfaktorische Epithel unterlagerte, bestand der Epithelschenkel links im Bild aus respiratorischem Epithel, was an den zahlreichen eingelagerten mukösen Drüsen zu erkennen war (Abb. 26a). Die *Glandulae olfactoriae* waren bei diesem Vogel durch den schlechten allgemeinen Erhaltungszustand des Gewebes lytisch verändert, aber noch in der Position erkennbar (Abb. 26b, c). Auch bei Kongo-Graupapagei #38763 konnten

Sinneszellen, Stützzellen und Basalzellen unterschieden werden. Zusätzlich stellten sich bei diesem Tier auch Bereiche mit Einlagerungen von dunklen Pigmenten dar. Sie waren im Randbereich des Nervengewebes am Übergang ins olfaktorische Epithel und auch in zentralen Bereichen des olfaktorischen Epithels zu erkennen (Abb. 26d).

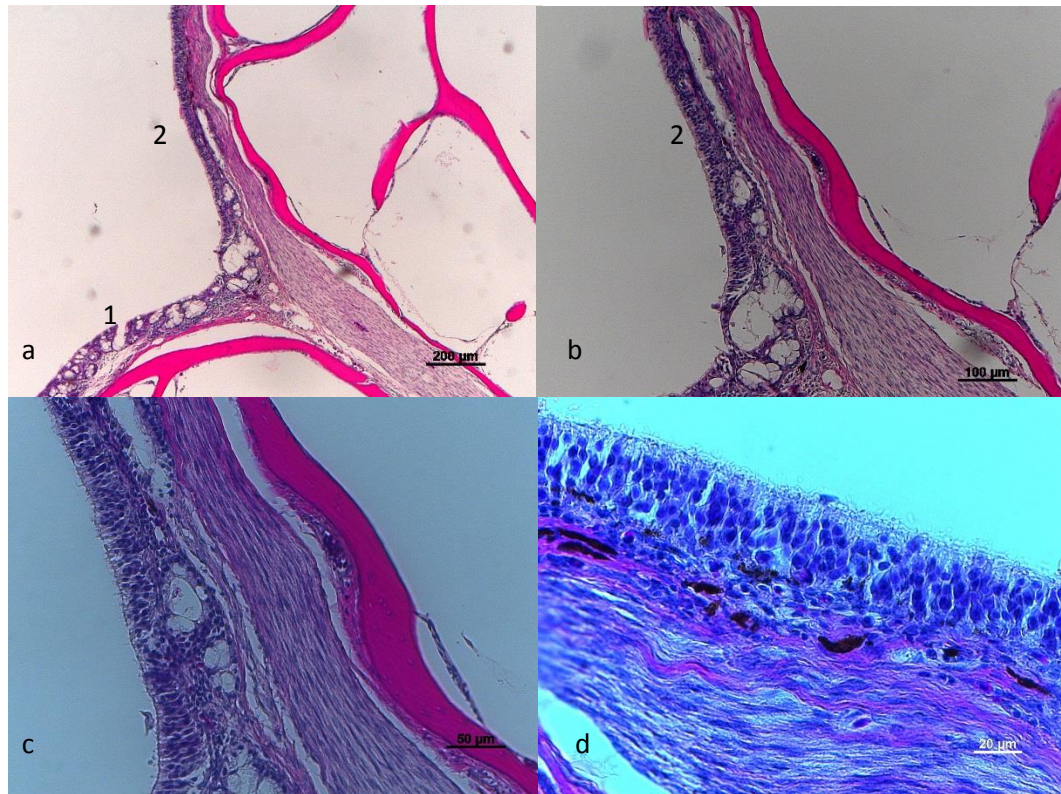


Abb. 26 a) und b) Kongo-Graupapagei #38763 (mit nachgewiesener Bornavirus-Infektion), Austritt Riechnerv in Nasenhöhle, Übersicht, links unten im Bild respiratorisches Epithel mit mukösen Drüsen (1), auf dem Nerv aufgelagertes olfaktorisches Epithel (2), Ablösung des Gewebes vom Knochen, Färbung Hämatoxylin-Eosin, c) Verbund der Epithelschichten größtenteils gelöst, aufgelagert auf den Nervenstrang liegen die dem olfaktorischen Epithel untergelagerten *Glandulae olfactoriae*, Färbung Hämatoxylin-Eosin, d) dunkle Pigmentablagerungen unter dem olfaktorischen Epithel erkennbar, zahlreiche Sinneszellen mit aufsitzenden Riehhärchen, unterlagert von Riechnervenfasern, Färbung Hämatoxylin-Eosin

Bei der immunhistochemischen Färbung der Präparate von Kongo-Graupapagei #38763, der mit PaBV-2 infiziert war, konnte eine intensive Färbung im gesamten Nervenstrang beobachtet werden. Sowohl die Zellkerne als auch das Zytoplasma

haben Antigen-positiv reagiert (Abb. 27a, b). Im olfaktorischen Epithel konnte in allen Zellarten eine N-Protein-spezifische Reaktion im Zellplasma nachgewiesen werden. Sowohl die Sinneszellen, als auch die Stütz- und Basalzellen waren ausnahmslos intensiv gefärbt. Allerdings waren nur vereinzelt auch Zellkerne betroffen, und zusätzlich waren die schon aus der Hämatoxylin-Eosin-Färbung bekannten dunkel schwarz-braun pigmentieren Strukturen vorhanden. Ob diese Bereiche eine positive immunhistochemische Färbung zeigen, war nicht zu differenzieren (Abb. 27c, d).

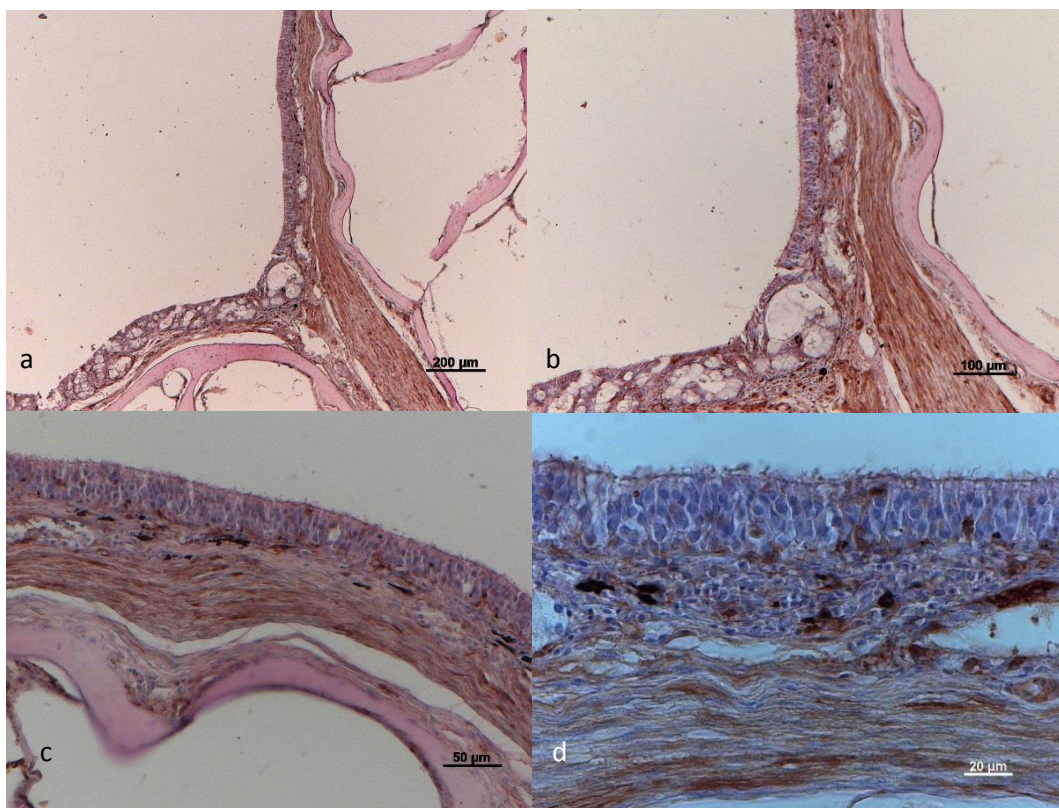
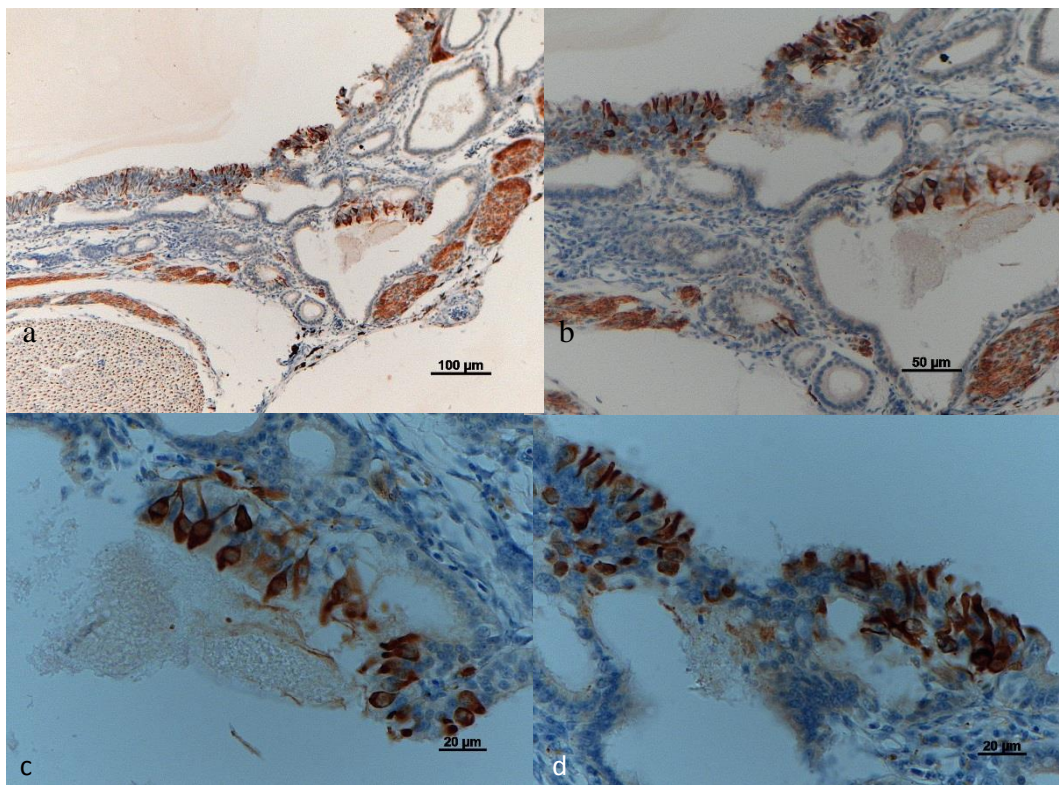


Abb. 27 a) Kongo-Graupapagei #38763 (mit nachgewiesener Bornavirus-Infektion), Austritt Riechnerv, Übersicht, Axone des Riechnervs großflächig positiv angefärbt, Färbung IHC Bornavirus, b) eine diffuse positive Anfärbung ist im gesamten olfaktorischen Epithel zu erkennen, auch in der *Lamina propria* ist in zahlreiche Zellen (Zellkerne und auch Zellplasma) ein Nachweis von Bornavirus-Antigen erfolgt, Färbung IHC Bornavirus c) olfaktorisches Epithel, diffuse Anfärbung des kompletten Epithels, aber fast ausschließlich im Zellplasma, Zellkerne im untergelagerten Gewebe vereinzelt betroffen, Riechnervenfasern komplett positiv gefärbt, Abhebung vom Knochen, Färbung IHC Bornavirus, d) neben den aus der Hämatoxylin-Eosin-

Färbung bekannten dunkel schwarz-braun pigmentierten Strukturen positive Befunde des Nervengewebes und positive Anfärbung des Zellplasmas der Riechzellen, Färbung IHC Bornavirus

Zur differenzierten Darstellung der Sinneszellen im olfaktorischen Epithel wurde beispielhaft eine immunohistochemische Färbung mit β -III-Tubulin-Antikörper durchgeführt. Mit dieser Färbung wurden Nervenzellfortsätze detektiert, die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit Hämalaun. So konnten bei dem PaBV-2-positiv getesteten Kongo-Graupapagei #45040 die kolbenförmigen Riechzellen und die dem olfaktorischen Epithel untergelagerten Nervenfaserbündel identifiziert werden (Abb. 28a, b). Im Vergleich mit den zentralen Abschnitten des Riechnervs nahe am Austritt in die Nasenhöhle (Abb. 28c, d), war in den weiter peripher liegenden Bereichen eine deutlich geringere Anzahl an Nervenzellfortsätzen erkennbar (Abb. 28e). Eine Färbung des Großhirns wurde zur Evaluierung des Antikörpers durchgeführt, da dieser nicht für Papageien beschrieben war (Abb. 28f).



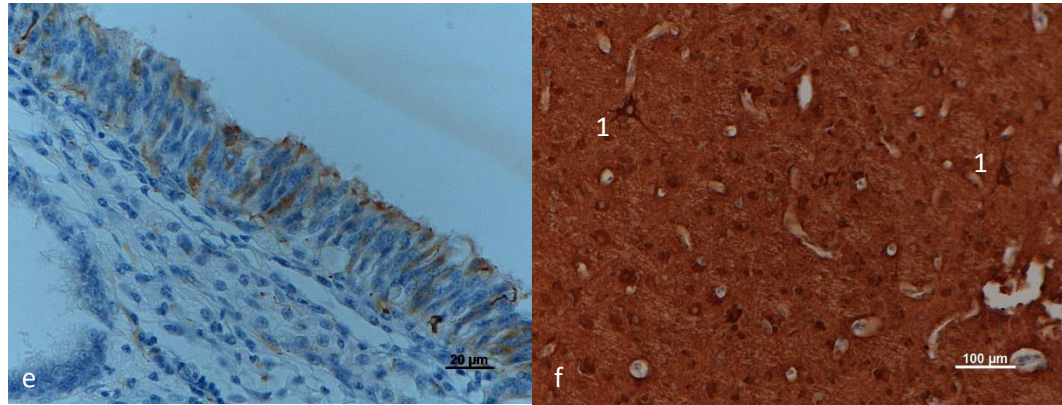


Abb. 28 Kongo-Graupapagei #45040 (mit nachgewiesener Bornavirus-Infektion) a) Übersichtsaufnahme der zentrale Austrittsstelle des Riechnerven in die Nasenhöhle, b)-d): Ausschnittvergrößerungen der zentralen Austrittsstelle des Riechnerven in die Nasenhöhle, Darstellung (Braunfärbung) einzelner birnenförmiger Riechzellen und deren Fortsätze, immunhistochemische Anfärbung ausschließlich von Zellplasma, Färbung IHC β -III-Tubulin, Gegenfärbung mit Hämalaun, e) peripher der Austrittsstelle des Riechnervs, nur schwache Anfärbung des Zellplasmas einzelner Riechzellen, f) Großhirn, IHC Färbung des β -III-Tubulin, durchgeführt zur Evaluierung der Bindung des Antikörpers bei Kongo-Graupapageien, gesamtes Neuropil angefärbt, besonders markant sind zwei Spitzendendriten (1) , Färbung IHC β -III-Tubulin

3.4. Tränendrüse (*Glandula lacrimalis*)

Die Tränendrüse liegt beim Hausgeflügel im Bereich des temporalen Augenwinkels. Sie zeichnet sich wie alle serösen Drüsen durch das Absetzen von dünnflüssigem Sekret aus. Ihr Endstück ist eng, der Zellkern ist basal gelegen und kugelig geformt. Das Zytoplasma ist azidophil und granuliert.

3.4.1. Wellensittich (*Melopsittacus undulatus*)

In Abb. 29a ist eine Übersicht mit Darstellung der Tränendrüse und der Harderschen Drüse des Wellensittichs #30675 zu sehen. Die serösen Tränendrüsen

sind an ihren weiteren Lumenöffnungen mit flacher Epithelauskleidung erkennbar. Bei Wellensittich #27913 waren zwischen den Lumen auch Erythrozyten in den begleitenden Blutgefäßen zu sehen (Abb. 29b). Die Drüse bestand nahezu nur aus serösen Endstücken und Ausführungsgängen und hatte wenig Interstitium. Eine Sekretfüllung war nicht sichtbar.

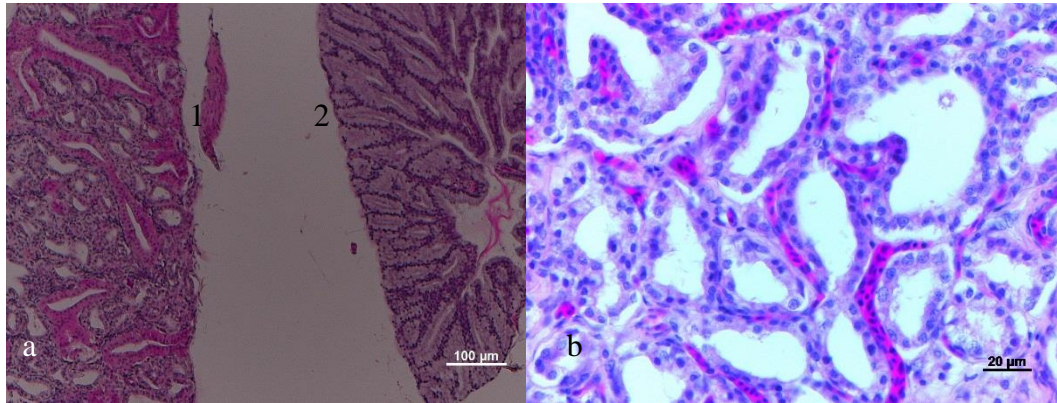


Abb. 29 a) Wellensittich #30675, Tränendrüse (1), Hardersche Drüse (2), Übersicht, Färbung Hämatoxylin-Eosin, b) Wellensittich #27913, Tränendrüse, seröse Endstücke und Ausführungsgänge, dazwischen Gefäße mit Erythrozyten, Färbung Hämatoxylin-Eosin

3.4.2. Nymphensittich (*Nymphicus hollandicus*)

Bei Nymphensittich #36539 konnte im Präparat das sezernierende Gewebe von den großlumigen Ausführungsgängen unterschieden werden (Abb. 30a). Die Tränendrüse von Nymphensittich #32828 zeigte seröse Endstücke mit großen Kernen in den auskleidenden, flachen Epithelzellen und Reste von Sekret in den Lumen der Ausführungsgänge (Abb.30b). Die dazwischenliegenden Drüsenzellen waren bei diesem Vogel zellkernreich.

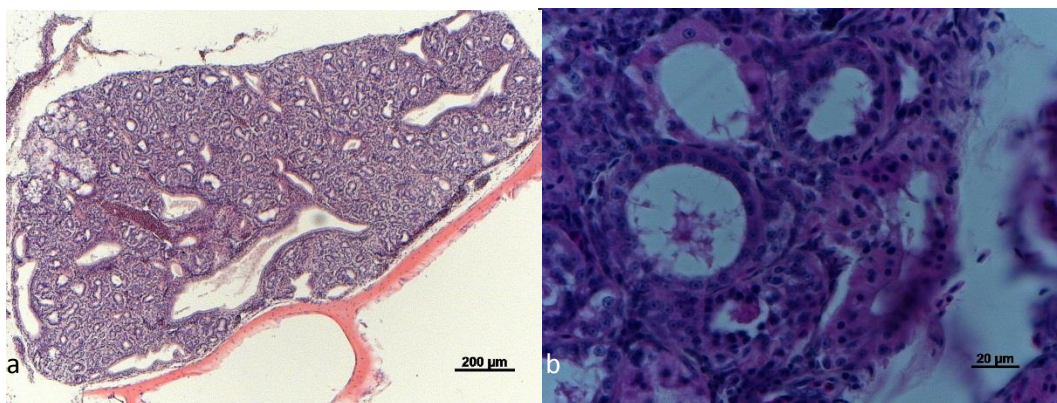
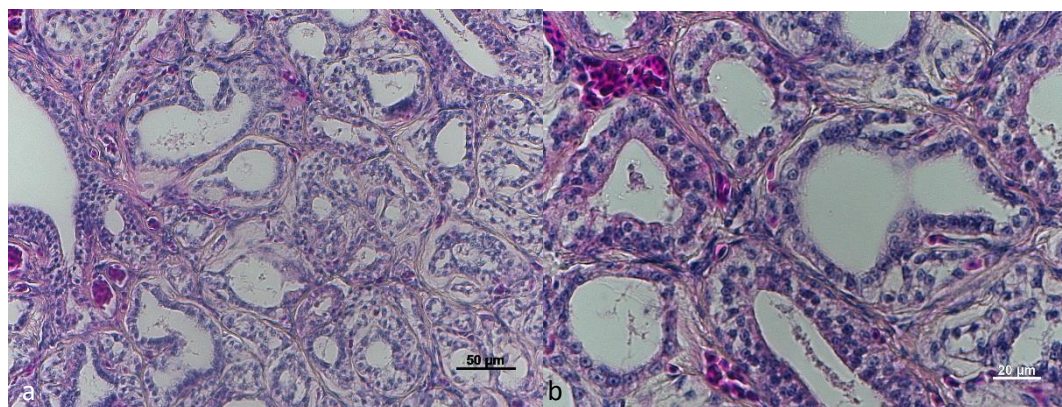


Abb. 30 a) Nymphensittich #36539, Tränendrüse, Übersicht, Färbung Hämatoxylin-Eosin, b) Nymphensittich #32828, Tränendrüse, Lumen der serösen Endstücke teilweise mit Sekret gefüllt, Färbung Hämatoxylin-Eosin

3.4.3. Kongo-Graupapagei (*Psittacus erithacus*)

Bei Kongo-Graupapageien war im Vergleich zu Wellensittichen mehr bindegewebiges Interstitium in den Tränendrüsen zu erkennen (Abb. 31a). Der Aufbau der serösen Endstücke war jedoch identisch, auch hier bildeten flache Epithelzellen mit großem, runden Kern, der basal gelegen war, die Auskleidung der Sammelgänge (Abb. 31b). Zwischen den Endstücken lagen bindegewebige Septen und einige Erythrozyten. Spuren von Sekretrückständen befanden sich in den Lumina.

Der mit PaBV-4 infizierte Kongo-Graupapagei #7044 zeigte in der Tränendrüse bei der immunhistologischen Färbung ein Vorkommen von Bornavirus-Antigen in allen Zelltypen, also in Epithelzellen und Drüsenzellen (Abb. 31c). Dabei waren viele Zellkerne, aber teilweise auch das Zellplasma angefärbt. Hauptsächlich erfolgte der Nachweis von N-Protein in den Epithelzellen der Ausführungsgänge und Endstücke, wobei meist lediglich einzelne Zellen betroffen waren. Bei Kongo-Graupapagei #37929, der in der konventionellen PCR positiv auf PaBV-2 getestet wurde, wurde Bornavirus-Antigen in der Tränendrüse nicht nachgewiesen (Abb. 31d).



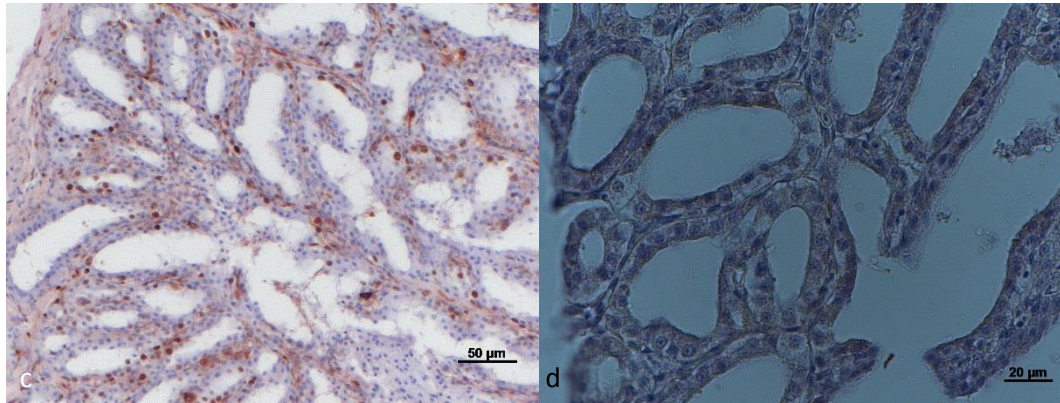


Abb. 31 a) Kongo-Graupapagei #29716, Tränendrüse, Übersichtsaufnahme mit serösen Endstücken und Sammelrohren, links im Bild kleine Ansammlungen von Erythrozyten, Färbung Hämatoxylin-Eosin, b) vereinzelte Endstücke haben sich aus dem Drüsengewebe gelöst, teilweise geringe Mengen von Sekret im Lumen, oben links Ansammlung von Erythrozyten, Färbung Hämatoxylin-Eosin, c) Kongo-Graupapagei #7044 (mit nachgewiesener Bornavirus-Infektion), Tränendrüse, in Lyse, sowohl positiv gefärbte Zellkerne als auch Zellplasma sind zu erkennen, Befall diffus, Färbung IHC Bornavirus, d) Kongo-Graupapagei #37929 (mit nachgewiesener Bornavirus-Infektion), Tränendrüse, keine positive Färbung auf Bornavirus erkennbar, Färbung IHC Bornavirus

3.4.4. Amazonen

Blaustirn-Amazone (*Amazona aestiva*), Kuba-Amazone (*Amazona leucocephala*)

Der histologische Aufbau der Tränendrüse bei Amazonen glich dem bei Wellensittichen. Die Tränendrüse der Blaustirn-Amazone #43830 wies bereits lytische Veränderungen auf (Abb. 32a). Die Epithelauskleidungen der serösen Endstücke waren größtenteils bereits aus dem Drüsenkörper gelöst, die Zellkerne lagen basal in Position (Abb. 32b). Die Lumina waren frei von Sekret.

Bei der PaBV-2-positiven Kuba-Amazone #20847 konnte in der immunhistochemischen Färbung in der Tränendrüse ein Nachweis von spezifischem Antigen erfolgen, während in der benachbarten Harderschen Drüse nur vergleichsweise wenige Zellen mit PaBV-N-Protein festgestellt wurden (Abb.

32c). In der Tränendrüse waren die Zellkerne der Epithelzellen der Auskleidung der Sammelrohre am meisten betroffen. Nur selten erfolgte der Nachweis auch im Zellplasma (Abb. 32d).

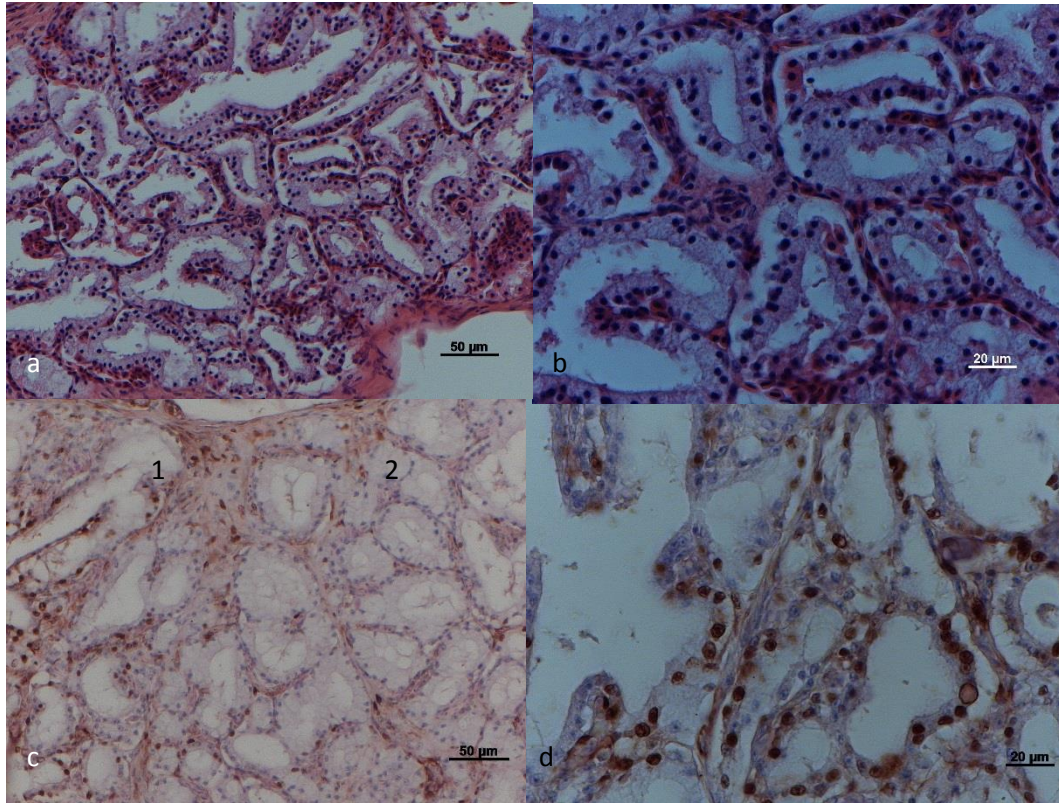


Abb. 32 a) Blaustirn-Amazone #43830, Tränendrüse, einige der serösen Endstücke haben sich schon aus dem Drüsengewebe gelöst, durch Lyse von Zellen wurden Zellkerne freigesetzt, Färbung Hämatoxylin-Eosin, b) Lyse der serösen Endstücke erkennbar, wenig Kontakt zum Interstitium, Färbung Hämatoxylin-Eosin, c) Kuba-Amazone #20847 (mit nachgewiesener Bornavirus-Infektion), starke positiv Färbung in Tränendrüse (1) und schwacher Befund in Harderscher Drüse (2), Färbung IHC Bornavirus, d) Tränendrüse, hochgradiger Befall der Zellkerne der Sammelrohre erkennbar, nur vereinzelt auch Zellplasma positiv angefärbt, Färbung IHC Bornavirus

3.4.5. Dunkelroter Ara/ Grünflügelara (*Ara chloropterus*)

Auch Aras wiesen wie Wellensittiche seröse Endstücke, Ausführungsgänge und wenig Insterstitium in der Tränendrüse auf. Bei dem Vogel #37599 waren durch

lytische Vorgänge die serösen Endstücke teilweise schon etwas aus dem Verbund gelöst und lagen als Zelldebris im Lumen der Endstücke. Einige Epithelauskleidungen lagen noch in Position und zeigten die klassischen, basal liegenden, kugeligen Zellkerne in den serösen Endstücken. Ein Interstitium war kaum ausgebildet. Bei diesem Vogel konnte in der immunhistochemischen Färbung kein Nachweis von Bornaviren erbracht werden (Abb. 33).

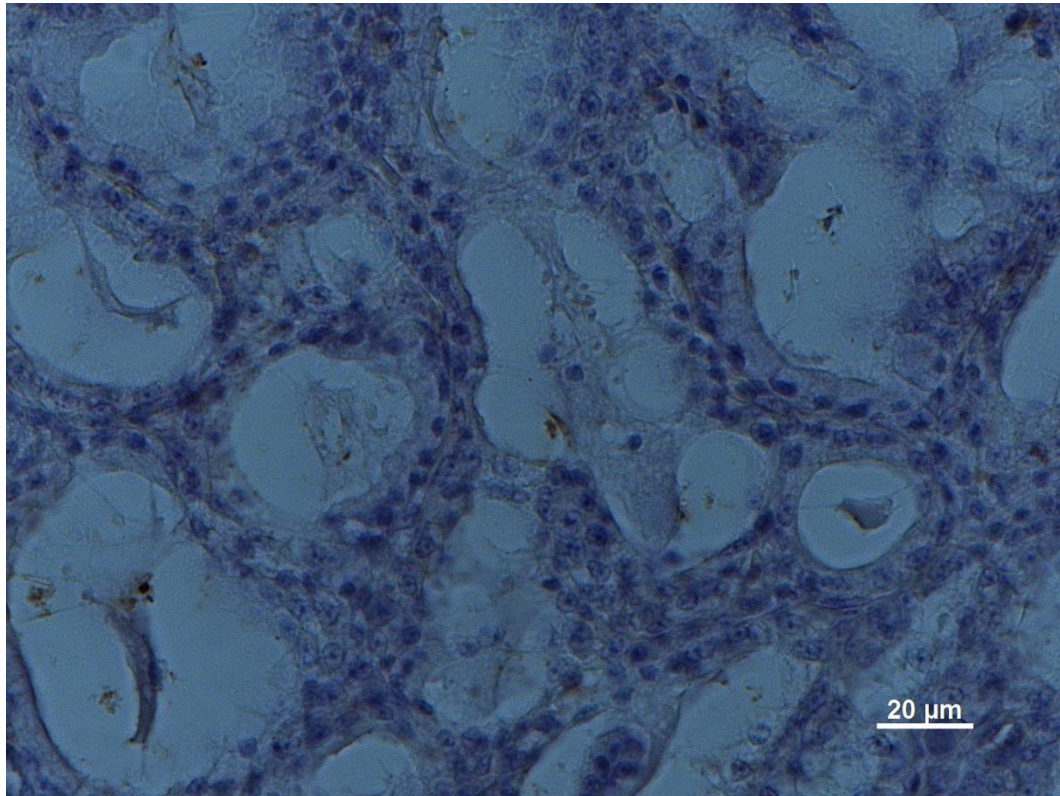


Abb. 33 Dunkelroter Ara #37599, Tränendrüse, durch Lyse sind die serösen Endstücke aufgelöst, teilweise wurden Zellkerne freigesetzt, Färbung IHC Bornavirus

3.5. Hardersche Drüse/ Nickhautdrüse (*Glandula palpebrae tertiae*)

Bei der Harderschen Drüse handelt es sich um eine extraepitheliale muköse Drüse, bei der das Lumen der Ausführungsgänge im Vergleich zu einer serösen Drüse deutlich weiter ausgebildet ist. Die Zellkerne sind stark abgeplattet und liegen basal der gut erkennbaren Zellgrenze an, das Zytoplasma ist basophil und wabig strukturiert. Dies wurde bei allen untersuchten Papageienarten gleichermaßen

festgestellt. In der vorliegenden Studie wurde ausschließlich der Typ I der bisher drei bei Vögeln beschriebenen Typen der Harderschen Drüsen nachgewiesen (Burns, 1974, 1975, 1992; Aitken & Survashe, 1977). Das bedeutet, es konnte stets eine zusammengesetzte tubuloalveoläre Drüse mit einem Typ von Lobuli, bestehend aus einem einheitlichen Typ von Epithelzellen, die die Ausführungsgänge der Drüse auskleideten, dargestellt werden. Die Sekretion bei Typ I wird als merokrin beschrieben (Wight *et al.*, 1971a).

Interstitielles Bindegewebe ist in der *Glandula membranae nictitantis* der Vögel in Septen vertreten, die keinerlei Blutgefäße, Fibroblasten oder andere Bindegewebselemente enthalten. Hardersche Drüsen des Typ I haben mäßige bis dichte Populationen von Plasmazellen, hauptsächlich im Bereich um den zentralen Ausführungsgang (Bang & Bang, 1968).

3.5.1. Wellensittich (*Melopsittacus undulatus*)

In der Übersicht stellte sich die *Glandula membranae nictitantis* beim Wellensittich (in Abb. 34a für Wellensittich #20001 gezeigt) als eine Drüse von Typ I mit tubuloalveolärer Zusammensetzung dar. Es waren keine größeren Blutgefäße und nur wenige bindegewebige Septen zu erkennen (Abb. 34a). Bei stärkerer Vergrößerung (Abb. 34b, Wellensittich #34424) stellten sich zahlreiche muköse Azini im Anschnitt dar, hauptsächlich in zwei Bereichen oben im Bild lagen wenige Erythrozyten zwischen den einzelnen Drüsengängen, diese könnten aus fenestrierten Kapillaren ausgetreten sein (Abb. 34b). Die Zellkerne der mukösen Drüsenendstücke lagen basal in den hohen Epithelzellen, die die Azini auskleideten. Ansammlungen von lymphatischen Zellen waren nur in kleinen, örtlich begrenzten Lokalisationen zu erkennen.

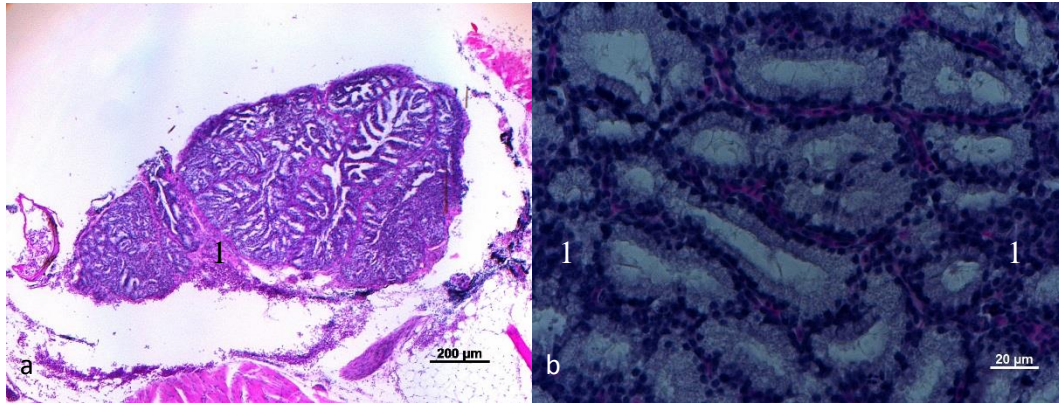


Abb. 34 a) Wellensittich #20001, Hardersche Drüse, Übersicht mit bindegewebigem Septum (1), Färbung Hämatoxylin-Eosin, b) Wellensittich #34424, Hardersche Drüse, zahlreiche muköse Azini umgeben von Ansammlungen lymphatischer Zellen (1), zwischen den Azini sind wenige Erythrozyten zu erkennen, Färbung Hämatoxylin-Eosin

3.5.2. Nymphensittich (*Nymphicus hollandicus*)

Auch bei den Nymphensittichen wurde eine *Glandula membranae nictitantis* vom Typ I festgestellt. Bei dem Nymphensittich #36539 konnten wie bei Wellensittichen zentral in der Drüse bindegewebige Septen erkannt werden. Größere Blutgefäße fehlten (Abb. 35a). Bei Nymphensittich #32828 stellte sich eine deutliche Ansammlung von Plasmazellen oder Lymphozyten neben dem Ausführungsgang mit den säulenartigen Epithelzellen dar (Abb. 35b). Dazwischen lagen die Azini ohne Sekretfüllung und links unten im Bild wenige Erythrozyten in einer fenestrierten Kapillare.

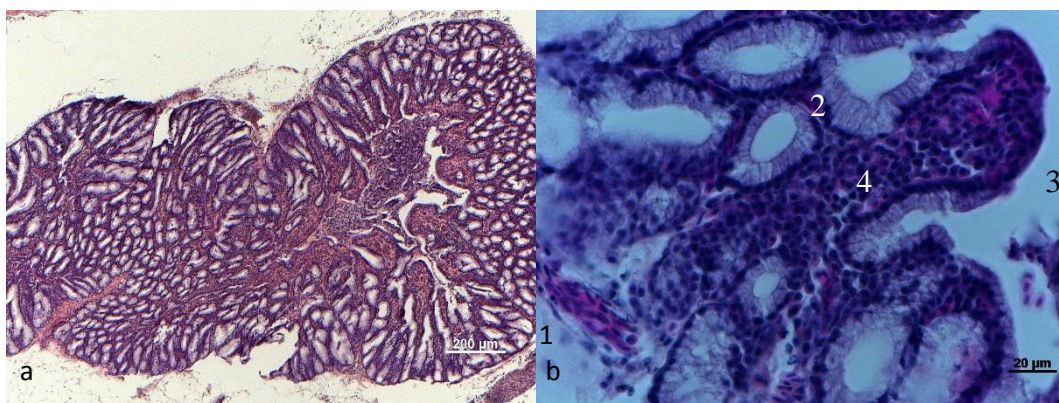


Abb. 35 a) Nymphensittich #36539, Hardersche Drüse, Übersicht, Färbung Hämatoxylin-Eosin, b) Nymphensittich #32828, Hardersche Drüse, im linken Bildbereich beginnende Lyse mit Lösung der Zellverbände und Freisetzung der Zellkerne, Erythrozyten (1), Azini (2), Lumen des Sammelganges (3), lymphatische Zellen (4), Färbung Hämatoxylin-Eosin

3.5.3. Ziegensittich (*Cyanoramphus novaezelandiae*)

Der Ziegensittich #38035 zeigte in der Harderschen Drüse keine erkennbaren Septen, die drei dunklen Streifen, die sich in Abb. 36a darstellen, sind Falten im Präparat und daher als Artefakt zu beurteilen (Abb. 36a). Auch hier lag im Aufbau ein Typ I der Harderschen Drüse vor. Der zentrale Sammelgang war mit Zelldebris gefüllt, was jedoch vermutlich mit dem schlechten Zustand des Untersuchungsmaterials zusammenhing. Bei detaillierter Betrachtung der Drüse mit stärkerer Vergrößerung konnte eine fortgeschrittene Lyse bemerkt werden (Abb. 36b). Die mukösen Endstücke waren von zahlreichen Zellkernen umgeben. Hierbei handelte es sich vermutlich um Lymphozyten oder Plasmazellen. Auch im Lumen der Azini waren zahlreiche einzelne Zellkerne und Zelldebris erkennbar.

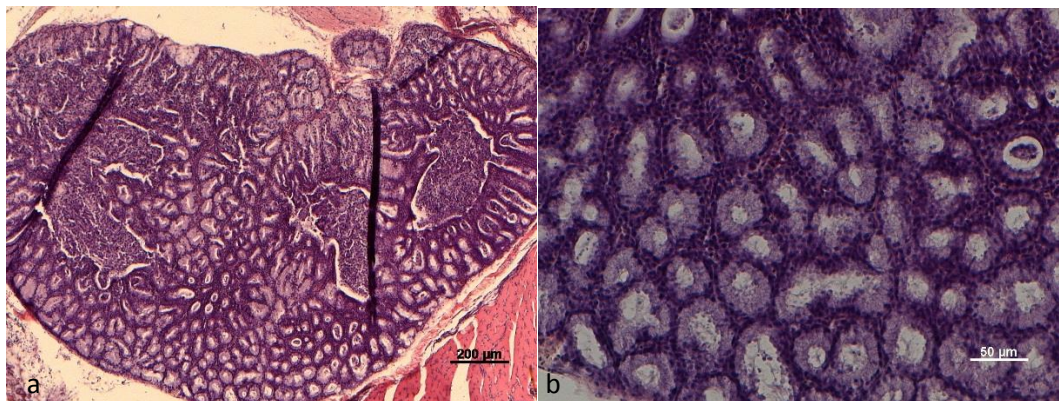


Abb. 36 a) Ziegensittich #38035, Hardersche Drüse, zwei vertikale Falten im Objekt, Sammelgang mit Debris gefüllt, Färbung Hämatoxylin-Eosin, b) beginnende Lyse erkennbar, die mukösen Endstücke haben die Struktur bereits verloren und lösen sich auf, Färbung Hämatoxylin-Eosin

3.5.4. PrachtroSELLa (*Platycercus eximius*)

Bei dem PrachtroSELLa #29960, bei dem in der real-time-PCR ein positiver Nachweis von PaBV-4 erfolgte, konnte in der Harderschen Drüse vom Typ I das Auftreten von bindegewebigen Septen und auch drei kleine, anliegende Blutgefäße dargestellt werden (Abb. 37a). Der Drüsenkörper an sich war jedoch durch Lyse in einem schlechten Erhaltungszustand und daher nur eingeschränkt beurteilbar. Die Azini verzeichneten nahezu kein freies Lumen, die Zellgrenzen schienen aufgelöst und die Zellkerne frei beweglich zu sein (Abb. 37b). Eine starke Anhäufung von Plasmazellen oder Lymphozyten konnte nicht beobachtet werden.

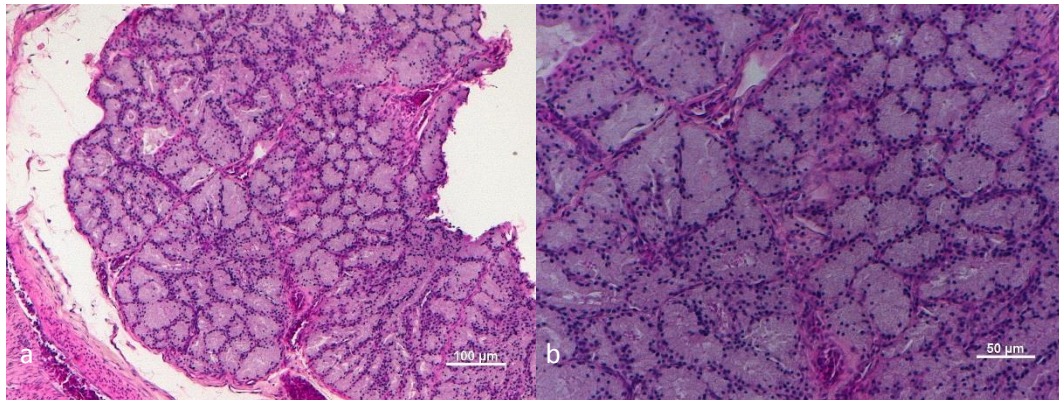


Abb. 37 a) PrachtroSELLa #29960 (mit nachgewiesener Bornavirus-Infektion), Hardersche Drüse, Probenmaterial schon sehr lytisch verändert, Färbung Hämatoxylin-Eosin, b) durch Lyse stark verändertes Drüsengewebe, Lumen der mukösen Endstücke nahezu verschwunden, teilweise Zellkerne freigesetzt, Färbung Hämatoxylin-Eosin

Bei der immunhistochemischen Färbung konnte weder in der Tränendrüse noch in der Harderschen Drüse von PrachtroSELLa #29960 ein Bornavirus-Antigennachweis erbracht werden (Abb. 38a). Im Großhirn, aber nicht in benachbarten Arealen des Gehirns, konnten bei gleichem Färbeprotokoll in einigen Neuronen dieses Vogels PaBV-N-Antigen nachgewiesen werden (Abb. 38b).

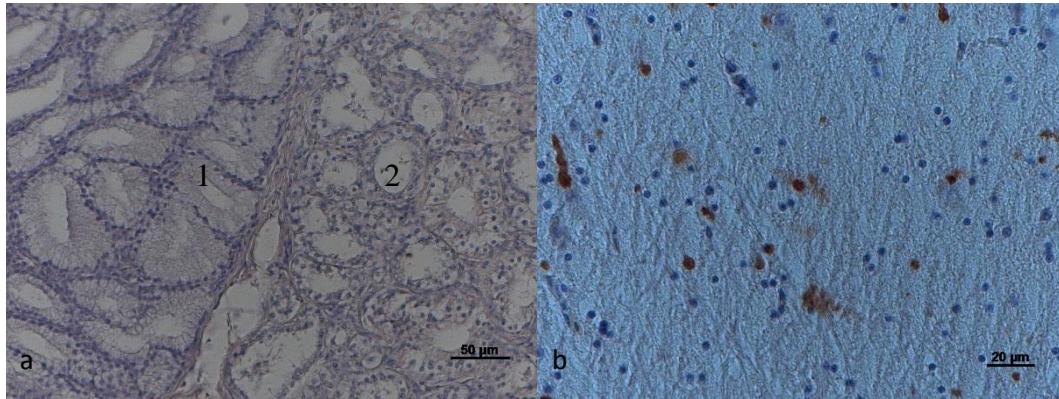


Abb. 38 a) Prachtrosella #29960 (mit nachgewiesener Bornavirus-Infektion), Hardersche Drüse (1) und Tränendrüse (2), schwache Gegenfärbung mit Hämalaun bei fehlendem Nachweis von Antigen, Färbung IHC Bornavirus, b) Großhirn, in einzelnen Neuronen sind hauptsächlich die Zellkerne, wenig auch das Zellplasma antigenspezifisch angefärbt , Färbung IHC Bornavirus

3.5.5. Schwarzohrpapagei (*Pionus menstruus*)

Bei dem Schwarzohrpapagei #34789 trat ebenfalls der Typ I der *Glandula membranae nictitantis* auf. Im Randbereich des Drüsenkörpers waren die bindegewebigen Septen gut zu erkennen (Abb. 39a). Auch bei diesem Vogel waren keine größeren Blutgefäße erkennbar. Hier konnte eine Ansammlung von Lymphozyten und/oder Plasmazellen im zentralen Bereich der Drüse dargestellt werden, während in den Außenbereichen des Drüsenkörpers hauptsächlich Azini mit dazwischen liegenden kleine Kapillaren beobachtet wurden (Abb. 39b).

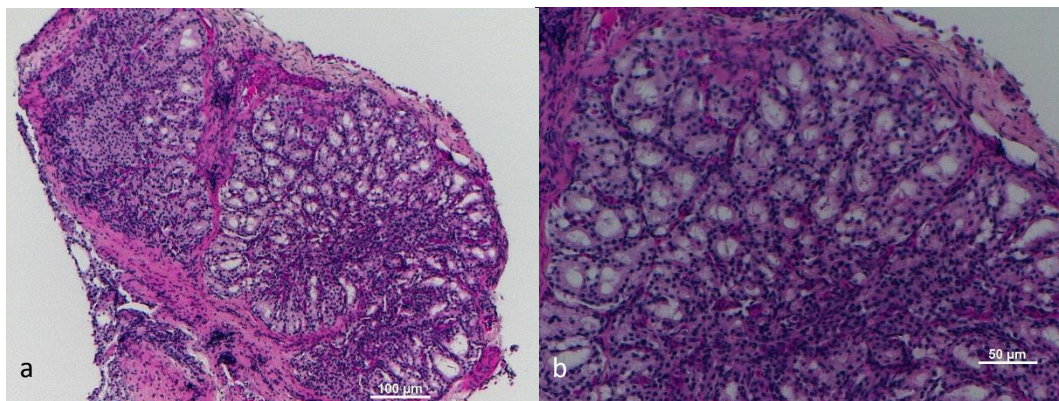
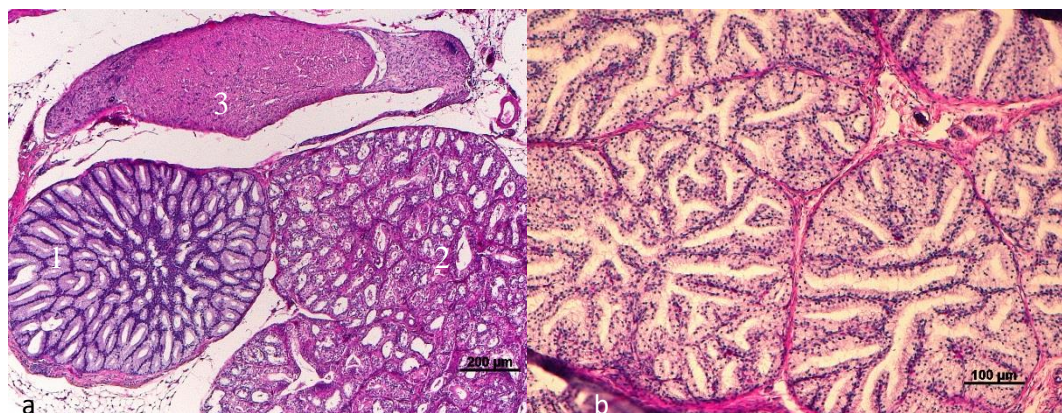


Abb. 39 a) Schwarzohrpapagei #34789, Hardersche Drüse, durchzogen von Bindegewebssepten, Färbung Hämatoxylin-Eosin, b) zentral zahlreiche

Lymphozyten und/oder Plasmazellen, außen muköse Azini, teilweise mit wenig Sekret im Lumen, Färbung Hämatoxylin-Eosin

3.5.6. Kongo-Graupapagei (*Psittacus erithacus*)

Auch bei den Kongo-Graupapageien war die Hardersche Drüse als Typ I angelegt. Bei Kongo-Graupapagei #34349 konnte der Anschnitt des Sehnervs, die Tränendrüse und die *Glandula membranae nictitantis* nebeneinander im Präparat dargestellt werden (Abb. 40a). Dabei war der Unterschied zwischen der serösen Tränendrüse und der mukösen Harderschen Drüse sehr gut sichtbar. Die Anhäufung der Lymphozyten und/oder Plasmazellen im Zentrum des Drüsenkörpers der Harderschen Drüse sowie die fehlende Versorgung mit größeren Blutgefäßen war ebenfalls zu erkennen. Bei Kongo-Graupapagei #29823 war die lobuläre Unterteilung durch bindegewebige Septen darstellbar (Abb. 40b). Vermutlich durch lytische Veränderungen bedingt waren viele Zellkerne nicht in basaler Lokalisation zu finden. Eine Ansammlung von Lymphozyten oder Plasmazellen lag bei diesem Vogel in der Harderschen Drüse nicht vor. Bei Kongo-Graupapagei #38763 konnte die randständige Lage der Azini und die Ansammlung von Plasmazellen und Lymphozyten im zentralen, rechten Bildbereich verdeutlicht werden (Abb. 40c, d). Auch bei diesem Vogel war der Verband der Azini durch Lyse bereits vom sonstigen Drüsenkörper im Trennungsprozess begriffen, einige Zellkerne waren in den hohen Epithelzellen nach apikal verlagert.



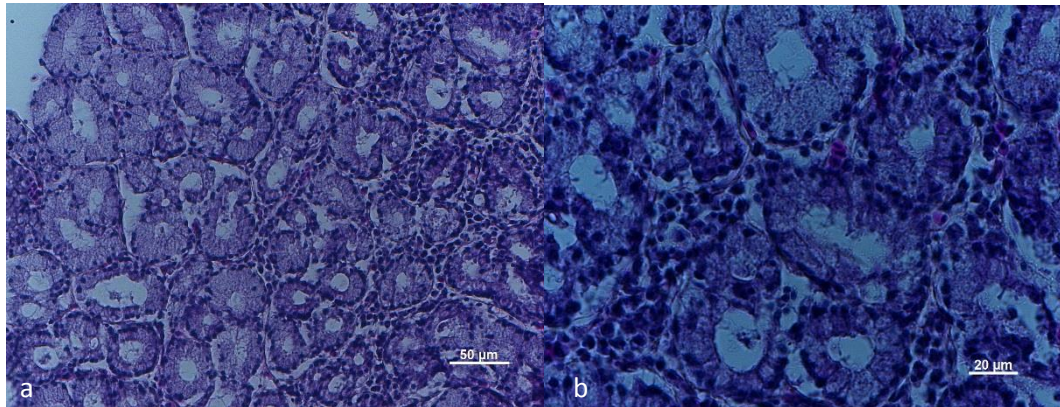


Abb. 40 a) Kongo-Graupapagei #34349 (mit nachgewiesener Bornavirus-Infektion), Hardersche Drüse (1), Tränendrüse (2), Sehnerv (3), Färbung Hämatoxylin-Eosin, b) Kongo-Graupapagei #29823, Hardersche Drüse, beginnende Lyse mit Freisetzung der Zellkerne, durch bindegewebige Septen deutliche lobuläre Unterteilung, Färbung Hämatoxylin-Eosin, c) Kongo-Graupapagei #38763 (mit nachgewiesener Bornavirus-Infektion), Hardersche Drüse, Färbung Hämatoxylin-Eosin, d) die lymphatischen Zellen und die mukösen Azini beginnen sich durch beginnende Lyse aus dem Zellverband zu lösen, Färbung Hämatoxylin-Eosin

Bei der immunhistochemischen Färbung konnte in den untersuchten Harderschen Drüsen der Kongo-Graupapageien #7044, #33402, #34349 und #38763 kein PaBV-N-Antigennachweis erbracht werden.

3.5.7. Amazonen

Blaustirn-Amazone (*Amazona aestiva*), Granada-Amazone (*Amazona rhodocorytha*), Jamaika-Amazone (*Amazona collaria*), Kuba-Amazone (*Amazona leucocephala*)

Bei Blaustirn-Amazone #37676 wurden die in der *Orbita* einander benachbarten Strukturen Sehnerv, Tränendrüse und Harderscher Drüse sowie zwei Blutgefäßen präpariert (Abb. 41a). Bei der Jamaika-Amazone #38435 konnte, wie bei der Blaustirn-Amazone zuvor, wieder der Typ I der Harderschen Drüsen erkannt werden (Abb. 41b). In der Struktur des Drüsenkörpers ließen sich die bindegewebigen Septen errahnen, die Azini lagen randständig, und zentral konnte

eine deutliche Anhäufung von Lymphozyten und/oder Plasmazellen zwischen den Ausführungsgängen festgestellt werden. Dabei lagen alle Zellkerne der Epithelzellen in den mukösen Endstücken streng basal und in den Lumen konnten nur minimale Sekretreste dargestellt werden (Abb. 41c, d). Lymphozyten oder Plasmazellen traten nur an wenigen Stellen lokal gehäuft auf. Größere Blutgefäße fehlten.

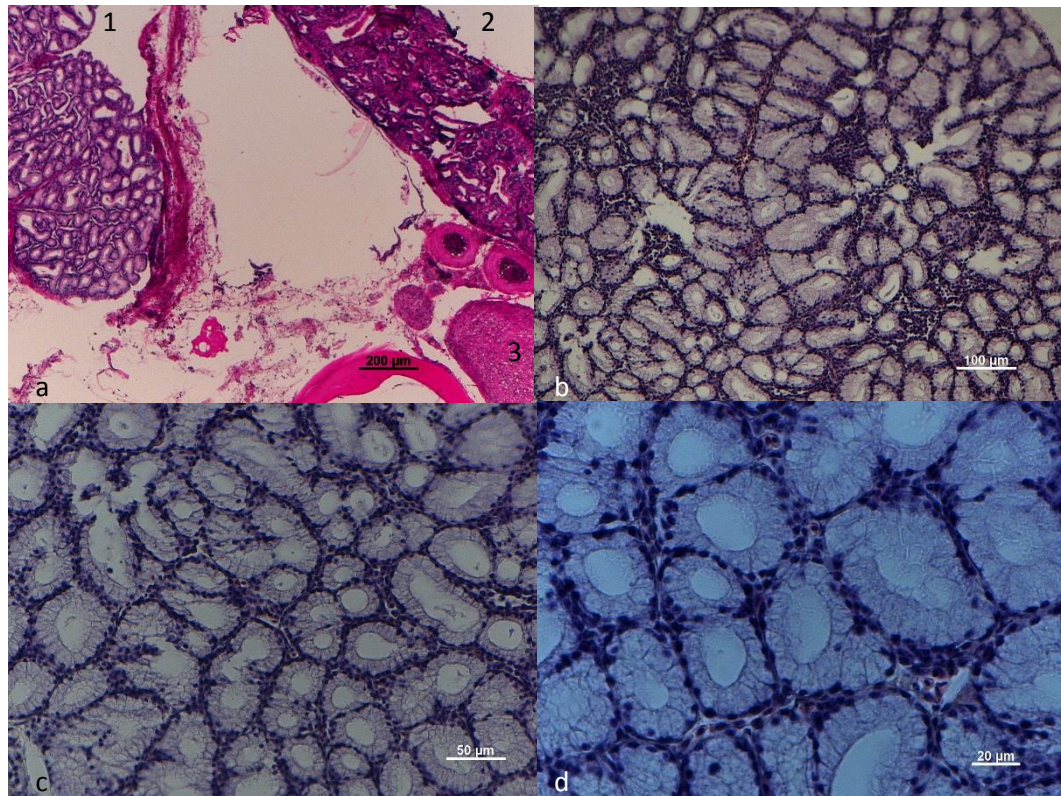


Abb. 41 a) Blaustirn-Amazone #37676 (mit nachgewiesener Bornavirus-Infektion), Hardersche Drüse (1), Tränendrüse (2), Sehnerv (3), Übersicht, Färbung Hämatoxylin-Eosin, b) Jamaika-Amazone #38435, Hardersche Drüse, Übersicht, Färbung Hämatoxylin-Eosin, c) Jamaika-Amazone #38435, Hardersche Drüse, Anschnitt zahlreicher muköser Endstücke, teilweise geringstgradig mit Sekret gefüllt, Färbung Hämatoxylin-Eosin, d) Jamaika-Amazone #38435, Hardersche Drüse, Anschnitt muköser Endstücke, gut zu erkennen sind die stark abgeplattet und maximal basal liegenden Zellkerne an der gut erkennbaren Zellgrenze, Zytoplasma ist wabig und basophil, zwischen den Endstücken lymphatische Zellen, Färbung Hämatoxylin-Eosin

Bei der PaBV-2-positiven Kuba-Amazone #20847 konnte in der immunhistochemischen Färbung in der Harderschen Drüse ein Nachweis von spezifischem Antigen erfolgen (Abb. 32c). Dabei waren die Zellkerne des Drüsenkörpers und auch einzelne Zellkerne in den Azini positiv angefärbt. Im Zellplasma waren fast ausschließlich die bindegewebigen Septen positiv braun angefärbt. Bei der Granada-Amazone #27144 zeigte sich ein ähnliches Bild, bei schlechterem Erhaltungszustand des Gewebes. Auch hier konnte größtenteils in den bindegewebigen Septen, hier hauptsächlich im Zellplasma, und nur vereinzelt in den Azini eine Darstellung von PaBV-N-Protein erfolgen.

3.5.8. Aras

Hybridara und Hahns Zwergara/ Blaustirnzwergara (*Diopsittaca nobilis*)

Bei den Aras konnte eine tubuloazinäre Drüse des Typ I gefunden werden. Die *Glandula membranae nictitantis* von Hybridara #118 ließ deutlich die interlobulären bindegewebigen Septen erkennen (Abb. 42a). Blutgefäße waren nicht sichtbar, jedoch kleine Erythrozytenansammlungen in Kapillaren. In der stärkeren Vergrößerung wurde deutlich, dass die Azini-auskleidenden Epithelzellen lytisch verändert waren, die Zellkerne befanden sich apikal und die Zellgrenzen waren kaum noch erkennbar (Abb. 42b). In der oberen Abbildungshälfte konnten Plasmazellen und/oder Lymphozyten im an den Sammelgang angrenzenden Bereich vermutet werden.

Bei Zwergara #34664 wurde die Hardersche Drüse in ihrem Randbereich von einem rupturierten Blutgefäß begleitet (Abb. 42c). Die kleinen Lobi wurden abgegrenzt durch bindegewebige Septen, die im Randbereich des Drüsenkörpers sehr stark ausgeprägt waren. Der Erhaltungszustand der Azini war nicht optimal, hier lagen die Zellkerne der Epithelzellen häufig in basaler Lokalisation (Abb. 42d).

In der immunhistologischen Färbung konnte bei dem positiv auf PaBV-4 getesteten Hybridara #118 in der *Glandula membranae nictitantis* ein Nachweis von PaBV-N-Protein erfolgen (Abb. 42e). Die positiven Zellen befanden sich versprengt im Drüsenkörper, eher im Bereich der Azini und nur gelegentlich in der Nähe der Sammelrohre. Dabei waren die Epithelzellen der Azini primär im Zellplasma und

nur gelegentlich im Zellkern betroffen. Aufgrund von lytischen Veränderungen befanden sich viele Zellkerne der Azini nicht in ihrer basalen Grundposition (Abb. 42f).

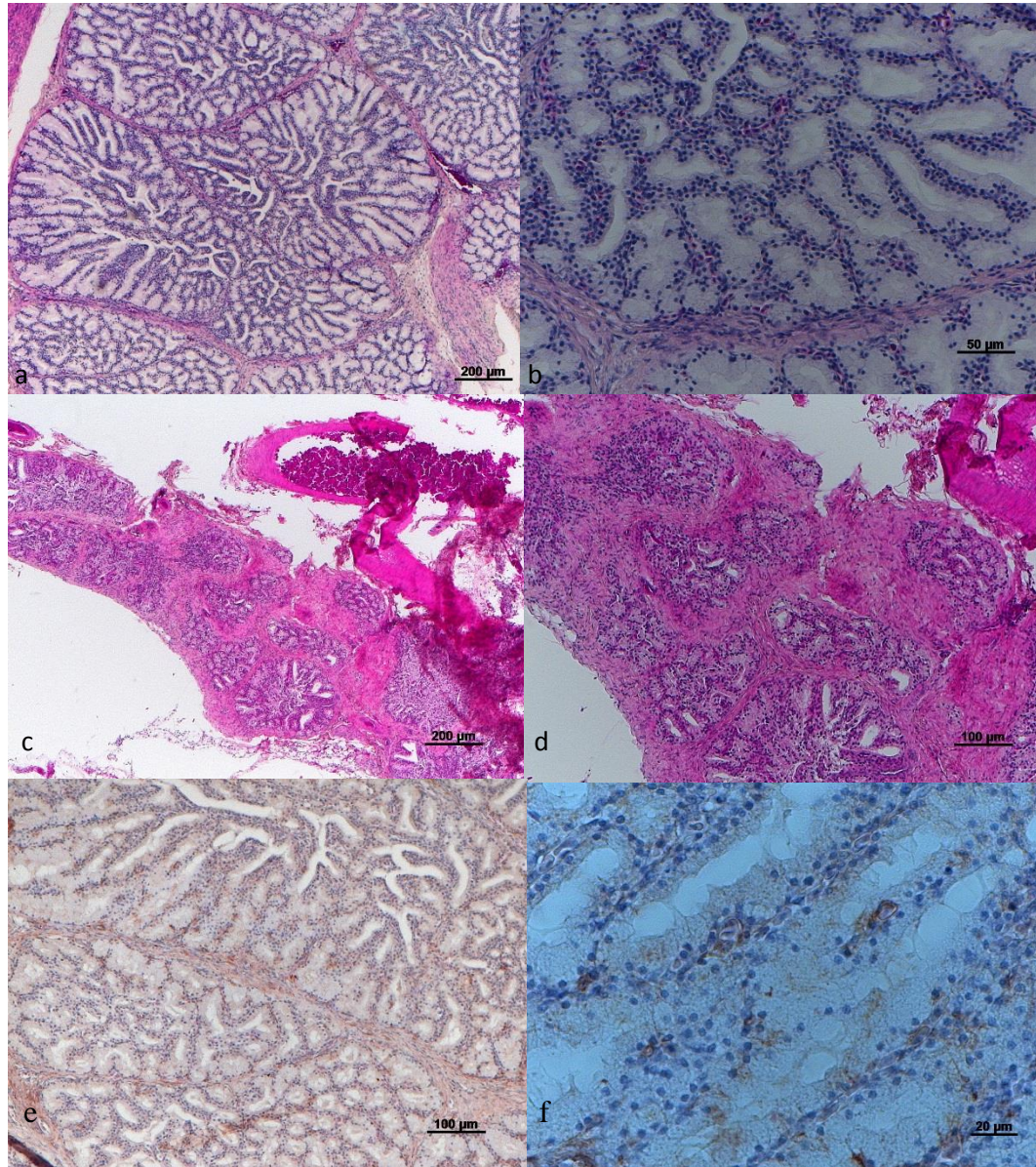


Abb. 42 a) Hybridara #118 (mit nachgewiesener Bornavirus-Infektion), Hardersche Drüse, Übersicht, gut zu erkennen ist die lobuläre Unterteilung durch bindegewebige Septen, Färbung Hämatoxylin-Eosin, b) Gewebe in Lyse, muköse Azini lösen ihre Struktur auf, Zellgrenzen kaum erkennbar, Zellkerne häufig nach apikal verschoben, Färbung Hämatoxylin-Eosin, c) Hahns Zwergara #34664, Hardersche Drüse, Übersicht im Randbereich, rechts oben rupturiertes und hochgradig mit Erythrozyten gefülltes Blutgefäß, Färbung Hämatoxylin-Eosin, d) sehr großflächige bindegewebige Flächen zwischen den Drüsenlobi, Färbung Hämatoxylin-Eosin, e) Hybridara #118,

Bornavirus positiv, Hardersche Drüse, Übersicht, zentral vereinzelt positive Anfärbungen erkennbar, Färbung IHC Bornavirus, f) bei lysebedingtem Strukturverlust des Gewebes und Hintergrundfärbung einzelne, im Zellplasma und gelegentlich im Zellkern positiv reagierende Zellen erkennbar, Färbung IHC Bornavirus

3.5.9. Inkakakadu (*Cacatua leadbeateri*)

Die *Glandula membranae nictitantis* von Inkakakadu #36854 ließ sich ebenfalls dem Typ I zuordnen. Es waren bindegewebige Septen zu erkennen, die die Drüse in Lobi unterteilten (Abb. 43a). Blutgefäße waren in den Septen nicht enthalten. Das Material befand sich nicht in optimalem Erhaltungszustand, es waren autolytische Veränderungen wie eine Auflösung der Zellwände der hohen Epithelzellen in den Azini zu beobachten (Abb. 43b). Obwohl die Zellkerne bis auf wenige Ausnahmen in ihrer basalen Lage zu finden waren, waren die Zellgrenzen zwischen den einzelnen Epithelzellen nicht mehr erkennbar und in den mukösen Endstücken war ein Lumen häufig nicht mehr vorhanden. Eine Ansammlung von Plasmazellen oder Lymphozyten war nicht auffällig.

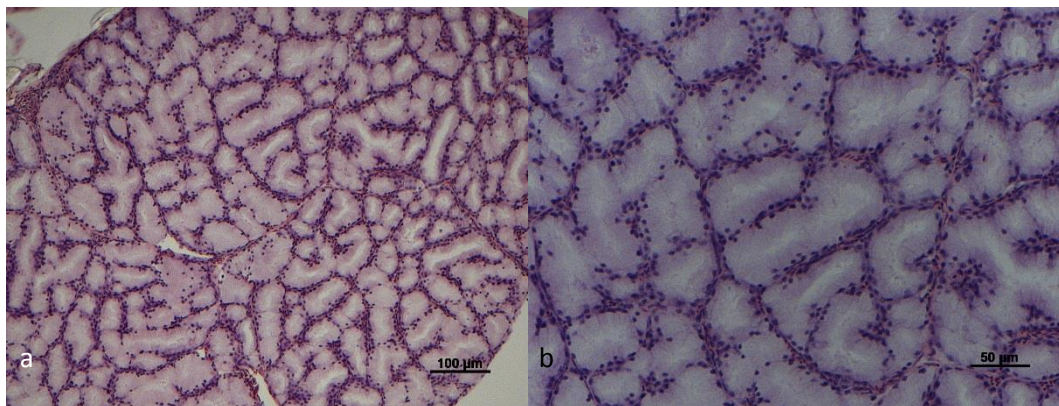


Abb. 43 a) Inkakakadu #36854, Hardersche Drüse, Übersicht, Abgrenzung der Lobi durch bindegewebige Septen, Färbung Hämatoxylin-Eosin, b) Lyse der Zellen, Zellgrenzen in den mukösen Endstücken kaum erkennbar, Zellkerne aus basaler Lage nach apikal verschoben, Färbung Hämatoxylin-Eosin

V. Diskussion

Das respiratorische Epithel bei Vögeln ist tierartspezifisch nicht sehr intensiv erforscht. Dies hängt vermutlich mit der notwendigen, höchst zeitaufwendigen Präparation des Kopfes und der Verfügbarkeit von Präparaten zusammen. Das Gleiche gilt für das olfaktorische Epithel, das aufgrund seiner kleinformatischen Abmessung und seines anatomisch nicht genau festgelegten Lokalisationsortes häufig nur in Serienschnitten auffindbar ist. Bei Vögeln lassen sich detaillierte Beschreibungen dieser einzelnen Gewebestrukturen nur bei Haussperlingen (*Passer domesticus*), Truthähnen (*Meleagris meleagris gallopavo*) und Hühnern finden (Slonaker, 1921; Maxwell *et al.*, 1986; Liebich & Zengerling, 2010). Studien der Nasendrüse, der Tränendrüse und der Harderschen Drüse liegen ebenfalls nur wenig bzw. nicht an Papageienvögeln vor. Daher sollten die zu untersuchenden Strukturen zunächst bei nicht mit PaBV infizierten Papageienvögeln histologisch dargestellt und beschrieben werden. Anschließend erfolgte der Vergleich von den Geweben der mit Bornaviren infizierten Vögel.

Histologische Befunde

In der Literatur wird die *Concha nasalis media* als größte der drei Nasenmuscheln beim Vogel beschrieben, mit einer 1,5- (Haushuhn) bis 2,5fachen Windung (Wassergeflügel) nach ventral. Bei Tauben existiert nur eine ventrale Lamelle ohne Einrollung (Vollmerhaus & Sinowatz, 2004). Auch bei den in dieser Studie untersuchten Papageienvögeln fiel die mediale Nasenmuschel am größten aus. Zusätzlich zu einer stark ausgebildeten ventralen Windung konnte hier stets eine dorsale Windung beobachtet werden, die wie die ventrale mit respiratorischer Schleimhaut bedeckt war. Damit unterschied sich die Struktur der Nasenmuschel von der bei Hühnern und Tauben. Bei den einbezogenen Papageienvögeln erfolgte im *Vestibulum nasi* der Übergang von kutaner Schleimhaut, einem mehrschichtigen, verhornten Plattenepithel, zur respiratorischen Schleimhaut. *Vibrissae*-analoge Strukturen konnten bei keinem Vogel in diesem Areal gefunden werden.

Die Auskleidung der Nasenhöhle bildete ein mehrreihiges, hochprismatisches Flimmerepithel. Während in der Literatur das Auftreten von zahlreichen Becherzellen in der respiratorischen Schleimhaut beschrieben wird (Sinowatz & Rodler, 2011), wurden bei den untersuchten Papageienvögeln zahlreiche, meist mehrzellige exokrine, endoepitheliale, muköse oder mukoazinäre Drüsen, ähnlich wie bei Hühnern (Liebich & Zengerling, 2010), festgestellt. Während alle Epithelzellen der Basalmembran aufsaßen, erreichten nicht alle das freie Lumen der Nasenhöhle. Dadurch waren nicht alle Kerne auf der gleichen Höhe gelegen. Wenn eine Zelle die Oberfläche und somit das Lumen der Nasenhöhle erreichte, trug sie Kinozilien. Die schleimabsondernden Drüsenzellen im Epithel saßen mit ihrem basalen Anteil fast vollständig der Basallamina auf. Vor allem im Randbereich der Windungen der *Concha nasalis media*, vermehrt an der konvexen Seite, ließen sich bei den untersuchten Vögeln zahlreiche Blutgefäße in der *Lamina propria mucosae* darstellen. Sie könnten durch Schwellung das Lumen der Nasenhöhle einengen und die eingeatmete Luft verstärkt anwärmen. Die Ergebnisse der Befunde des respiratorischen Epithels entsprechen den Beschreibungen in der Literatur bei Hühnern (Liebich & Zengerling, 2010).

Die Nasendrüse, *Glandula nasalis*, war in dieser Untersuchung bei allen Papageienvögeln außer bei Wellensittichen darstellbar. Es ist jedoch davon auszugehen, dass die Nasendrüse auch bei dieser Spezies vorhanden ist und die Darstellung nur aufgrund technischer Gründe nicht erfolgreich war. So ist nicht auszuschließen, dass die Wellensittich-Nasendrüsen aufgrund ihrer Kleinheit beim Zuschnitt der Schädel am Skalpell anhafteten und verrieben wurden oder dass sie beim mechanischen Einbettprozess durch die Löcher der durchgängig perforierten Innenfläche der Einbettkassetten herausgefallen sein könnten. Die im Vergleich zu Hühnervögeln bei den Papageienvögeln in dieser vorliegenden Studie beobachtete Verlagerung der Nasendrüse weiter nach kaudal entsprach den Angaben bei Technau (1936). Die Nasendrüsen aller untersuchten Papageienvögel ließen sich nach ihrer Lokalisation dem Typ II nach Technau (1936) zuordnen, sie hatten also eine orbitale Lage. Es stellte sich eine tubuloazinäre merokrine Drüse mit seröser Sekretion dar. Begleitet wurde sie in den untersuchten Präparaten stets von kleinen Blutgefäßen und einem Nerv. Die Ausführungsgänge wurden von einer Lage großkerniger Zylinderzellen mit basal liegenden Kernen ausgekleidet, diese waren

umschlossen von einer Schicht kleiner, dicht gedrängter Zellen. Becherzellen waren nicht zu sehen.

Die *Regio olfactoria* wurde nur bei einigen Vögeln, und zwar bei den Kongo-Graupapageien (*Psittacus erithacus*) #38763 und #45040, dem Nymphensittich (*Nymphicus hollandicus*) #36539 und dem Schwarzohrpapagei (*Pionus menstruus*) #34789, beispielhaft durch Serienschritte aufgesucht und beurteilt. Es handelt sich hier um die erste Beschreibung des Riechepithels bei Papageienvögeln. Wie in der Literatur für andere Vögel beschrieben (Liebich, 2010; Sinowatz & Rodler, 2011), stellte sich das olfaktorische Epithel als einschichtiges, mehrreihiges, hochprismatisches Epithel mit primären Sinneszellen (bipolare Nervenzellen, Riechzellen, *Epitheliocyti neurosensorii olfactorii*), die das 1. Neuron der Riechleitung bilden, dar. Es wurde durch Stütz- und Basalzellen ergänzt. Auf den Sinneszellen fanden sich apikal Riechhärchen (modifizierte Zilien), die zum Binden der Geruchsstoffe dienen. Das olfaktorische Epithel enthielt bei den untersuchten Papageienvögeln keine Becherzellen oder muköse Drüsen, sondern Bowman-Drüsen. Die Bowman-Drüsen, auch *Glandulae olfactoriae* genannt, lagen in der *Lamina propria mucosae* und waren tubuloazinäre, seröse Drüsen, die durch das Abspülen von gebundenen Geruchspartikeln die Wahrnehmung von neuen Gerüchen ermöglichen. Ob, wie teilweise für andere Vögel beschrieben, (Aughey & Frye, 2001; Frewein & Sinowatz, 2004; König *et al.*, 2016; Liebich & Zengerling, 2010) farbliche Auffälligkeit wie Gelb- oder Braunfärbung bestehen, kann in dieser Studie nicht entschieden werden. Die Präparate wurden erst nach der Hämatoxylin-Eosin-Färbung beurteilt, daher kann zur ursprünglichen Farbgebung keine Angabe gemacht werden. Die Sinneszellen stellten sich auch bei den hier untersuchten Papageien als bipolare Nervenzellen dar, ihre Perikaryen waren intraepithelial lokalisiert, die großen, polygonalen, dunklen Zellkerne lagen bei den dargestellten Präparaten im mittleren Epithelbereich. Die Zellkörper waren birnen- bis flaschenförmig, die freie Oberfläche des dendritischen Nervenfortsatzes, der auch Sinneskolben genannt wird (Weyrauch *et al.*, 2009; Liebich, 2010), zeigte sich in der vorliegenden Studie als kolbenartig verdickt. Darauf saßen die Riechhärchen. Die Stützzellen, die die Sinneszellen umgaben, waren hochprismatische Zellen, sie haben Kontakt mit der Basallamina und durchzogen das Epithel. An ihrer freien Oberfläche fanden sich verzweigte Mikrovilli. Im Unterschied zu den Sinneszellen

waren ihre hellen Kerne länglich und apikal gelegen. An der Basallamina waren bei den untersuchten Vögeln kleine Basalzellen mit einem großen, runden, basal gelegenen Zellkern erkennbar.

Die Tränendrüse stellte sich bei den untersuchten Vögeln stets als zusammengesetzte, tubuloazinäre Drüse mit engen Endstücken dar. Dabei waren die Azini und Tubuli von einem flachen, säulenförmigen Epithel ausgekleidet, das Zytoplasma war eosinophil und die Zellkerne waren basal lokalisiert und kugelig geformt. In den *Septa*, die den Drüsenkörper durchzogen, und im intralobulären Bindegewebe waren Blutgefäße eingelagert. Die genaue physiologische Lage der Tränendrüsen konnte in dieser Arbeit nicht beurteilt werden, da die *Bulbi* der Vögel für eine andere Studie entnommen wurden und die Position der Drüsen dadurch möglicherweise verändert wurde. Die Darstellung der Drüsenkörper erfolgte erst nach der Einbettung der knöchernen Augenhöhle zusammen mit den nach der Bulbusentnahme in der *Orbita* anheftenden Strukturen. Die lokale Nähe zur Harderschen Drüse war aber auch nach der histologischen Aufarbeitung häufig noch erhalten und ermöglichte so einen guten Vergleich zwischen den beiden unterschiedlichen Drüsentypen. Analog zur Literatur (Aitken & Survashe, 1976; Frewein & Sinowatz, 2004) schien die Tränendrüse der hier einbezogenen Papageienvögel stets im Anschnitt kleiner ausgebildet als die Hardersche Drüse. Absolute Größenmessungen wurden in dieser Studie allerdings nicht durchgeführt.

Die *Glandula membranae nictitantis* der Vögel liegt laut Literatur dem Bulbus im nasalen Augenwinkel ventrokaudomedial auf (Reese *et al.*, 2009; Liebich 2010). Bei den in dieser vorliegenden Studie untersuchten Papageienvögeln konnte durch die Bulbusentnahme keine Aussage zur physiologischen Lokalisation der Drüsen in der *Orbita* getroffen werden. Obwohl bereits mehrere Veröffentlichungen über die Histologie der Hardersche Drüse erfolgt sind, wurden bislang noch keine Psittaziden einbezogen. Die bislang publizierten Studien zur Histologie befassten sich mit domestizierte Hühnern (*Gallus gallus domesticus*) (Ohshima & Hiramatsu, 2002), Hühnern (native fowl) (Mobini, 2012), Gänsen (*Anser anser domesticus*) (Boydak & Aydin, 2009), Mollard-Enten (*Anas sterilis*) (Dimitrov & Nikiforov, 2005), Haussperlingen (*Passer domesticus*) (Slonaker, 1921), Auerhähnen (*Tetrao*

urogallus major) (Kleckowska-Nawrot *et al.*, 2015) und Straußen (*Struthio camelus*) (Altunay & Kozlu, 2004).

In dieser Arbeit wurden keine genauen Vermessungen der Harderschen Drüsen vorgenommen. Aitken & Survashe (1976) veröffentlichten eine Studie zum Größenvergleich von der Hardersche Drüse (hier HD genannt) und der Tränendrüse (hier TD genannt) bei Galliformes (HD 20 mm, TD 8 mm Länge), Passeriformes (HD 4 mm, TD 2 mm Länge), Psittaciformes (HD 12 mm, TD 6 mm Länge), Columbiformes (HD 6 mm, TD 4 mm Länge) und Rheiformes (HD 24 mm, TD 5 mm Länge). Hier zeigte sich, dass die Größe der *Glandula membranae nictitantis* im Verhältnis zur Körpergröße bei den untersuchten Spezies sehr unterschiedlich ausfällt und die Drüse meist in der Augenhöhle verbleibt, wenn der Augapfel entnommen wird (Aitken & Survashe, 1976). Die *Ara* sp. stellen in der vorliegenden Studie die größten untersuchten Vögel. Trotzdem konnte auch bei ihnen die *Glandula membranae nictitantis* nur nach Einblockung der Augenhöhle und mikroskopischer Untersuchung aufgefunden werden, eine separate Entnahme durch makroskopische Lokalisation gelang nicht.

Die Ergebnisse des histologischen Aufbaus der Harderschen Drüse deckten sich mit den Veröffentlichungen von Burns (1974, 1975, 1992) und Survashe & Aitken (1978).

Die *Glandula membranae nictitantis* stellte sich bei den untersuchten Vögeln stets als extraepitheliale muköse Drüse mit einem, im Vergleich zu serösen Drüsen, deutlich weiter ausgebildeten Lumen der Ausführungsgänge dar. Sie erschien, wie bereits erwähnt, stets größer ausgebildet als die Tränendrüse des untersuchten Vogels. Genaue numerische Messungen haben in dieser Studie aber, wie bereits beschrieben, nicht stattgefunden. Der Drüsenkörper der Harderschen Drüse wurde bei den untersuchten Vögeln von einer dünnen, bindegewebigen Kapsel umgeben, die in Form von Septen zwischen den Lobuli nach innen zog. Im Drüsenkörper konnte der Zentralgang der Drüse, der 1. und 2. Sammelgang sowie die Azini unterschieden werden. Die Gänge wurden durch kubische oder säulenartige Epithelzellen ausgekleidet und variierten auch innerhalb einer Drüse in der Höhe, dies wurde zusätzlich verstärkt durch unterschiedliche Anschnittwinkel im Präparat. Der Zellkern der die Gänge auskleidenden Epithelzellen war stark

abgeplattet und lag basal der gut erkennbaren Zellgrenze an, das Zytoplasma war basophil und wabig strukturiert. Dies wurde bei allen dargestellten Papageienarten gleichermaßen festgestellt. Die Harderschen Drüsen der untersuchten Papageienvögel ließen sich dem Typ I laut Burns (1974; 1975; 1992) und Survashe & Aitken (1978) zuteilen, denn es wurde eine zusammengesetzte, tubulo-alveoläre Drüse bei den Vögeln dargestellt, deren einzelner Lobus mit einem einheitlichen Typus von Epithelialzellen ausgekleidet war. Neben den Psittaciformes bilden auch die Falconiformes, Galliformes und Columbiformes Hardersche Drüsen dieses Typs aus. Im Interstitium der Drüse fanden sich unterschiedlich große Populationen von Lymphozyten. Die Lymphozyten wurden häufig geballt um den 1. Sammelgang und den Ausführungsgang aufgefunden, dies deckt sich mit den Angaben in der Literatur (Bang & Bang, 1968; Rothwell *et al.*, 1972; Albin *et al.*, 1974). Die Ansammlung von lymphatischen Zellen war jedoch bei den verschiedenen Individuen sehr unterschiedlich ausgeprägt. Eine wichtige Funktion der Harderschen Drüse besteht in der Produktion von Immunglobulinen, sie liefert damit einen wichtigen Beitrag zur lokalen erworbenen spezifischen Abwehr gegen Infektionserreger, wie für Haushühner (Albin *et al.*, 1974; Neumann & Kaleta, 1977; Develaar *et al.*, 1982; Mansikka *et al.*, 1989) nachgewiesen wurde. Allerdings ist aktuell noch unklar, welche Immunglobuline zu unterschiedlichen Zeiten in der Harderschen Drüse gebildet werden. Dass die *Glandula membranae nictitantis* auch bei Papageien eine Funktion in der Immunabwehr besitzt, ist aufgrund der nachgewiesenen Lymphozyten aber zu vermuten.

Alle in dieser Studie untersuchten Vögel gehörten der zoologischen Ordnung der Psittaciformes an. Größere histologische Differenzen wurden zwischen den verschiedenen Arten nicht festgestellt. Der Aufbau des respiratorischen und olfaktorischen Epithels glich sich. Unterschiede in der Lokalisation der Nasendrüse oder eine andere tubuläre Zusammensetzung der Harderschen Drüse wurden nicht vorgefunden.

Auch histologische Unterschiede im Aufbau der Drüsen der verschiedenen untersuchten Vogelspezies dieser Studie lagen nicht vor. Geringfügige Differenzen in der Morphologie sind eher auf autolytische Veränderungen oder individuelle Unterschiede zurückführen. Bei den untersuchten, in die Studie mit einbezogenen,

Papageienvögeln handelte es sich ja um Patienten, die aus medizinischen und tierschutzrechtlichen Gründen euthanasiert werden mussten oder aus natürlichen Gründen verstorben waren. Ein Einfluss der Erkrankungen, die zur Euthanasie führten, ist bislang unbekannt, aber als Ursache für individuelle Unterschiede nicht auszuschließen.

Da für Papageienvögel nur sehr wenig Literatur zu den untersuchten Gewebestrukturen existiert, fehlen Vergleichsmöglichkeiten. Zum olfaktorischen Epithel liegen derzeit keine histologischen Studien an Papageien vor. Technau (1936) untersuchte die Nasendrüse in der Ordnung der Psittaciformes bei einem Zwergara (*Ara severa*), der auch ausführlich besprochen wurde, einem Kongo-Graupapagei (*Psittacus erithacus*), einem Fledermauspapagei (*Loriculus mindorensis*) und einem Buntsittich (*Platyercus eximius*). Seine Arbeit beschäftigte sich aber hauptsächlich mit der makroskopischen Morphologie und der anatomischen Lage der Drüsenkörper und den Ausführungsgängen sowie der Lokalisation der Mündung in der Nasenhöhle der verschiedenen Vogelspezies. Eine histologische Untersuchung erfolgte nur bei wenigen Vögeln, die stammesgeschichtlich verglichen werden sollten. Psittaziden waren nicht darunter (Technau, 1936). In der vorliegenden Studie ordneten sich die dargestellten Nasendrüsen immer dem Typ II nach Technau (1936) zu und wurden in der orbitalen Lage aufgefunden. Die Ausführungsgänge dieser tubuloazinären Drüse waren stets von einer Lage großkerniger Zylinderzellen mit basal liegenden Kernen ausgekleidet, diese waren umschlossen von einer Schicht kleiner, dicht gedrängter Zellen. Becherzellen waren nicht zu sehen.

Histologische Befunde bei mit PaBV-infizierten Papageienvögeln

Aviäre Bornaviren wurden bei Psittaziden erstmals im Jahr 2008 (Honkavuori *et al.*, 2008; Kistler *et al.*, 2008, Payne *et al.*, 2011b) als Verursacher der PDD nachgewiesen, eine Erkrankung, die bereits in den 1970er Jahren unter anderem als „macaw wasting syndrom“ beschrieben wurde und durch eine sehr variable, unter Umständen Jahre andauernde Inkubationszeit gekennzeichnet ist (Mannl *et al.*, 1987; Bond *et al.*, 1993, Rinder *et al.*, 2009a, 2009b). Ob die Inkubationszeit in Zusammenhang mit dem Alter der Vögel steht, ist derzeit unklar. Kistler *et al.*

(2010) ermittelten bei sehr jungen Tieren eine Inkubationszeit von 14 Tagen. Andererseits gibt es ältere Vögel, die über zwei Jahre Virus ausscheiden, ohne dabei selbst zu erkranken (De Kloet & Dorrestein, 2009). Bei den Papageien-Bornaviren geht man von persistierenden Infektionen aus (Staeheli *et al.*, 2010), und die Inkubationszeit bis zum Auftreten von PDD kann zwischen Tagen (Gregory *et al.*, 1997) bis hin zu Monaten und Jahren variieren (Gregory *et al.*, 1997; Gancz *et al.*, 2009a). Immer wieder wurden Fälle beschrieben, in denen die Tiere keine klinischen Symptome zeigten, aber trotzdem ein Nachweis von Bornavirus-RNA oder Anti-Bornavirus-Antikörper gelang (De Kloet & Dorrestein, 2009; Lierz *et al.*, 2009; Payne *et al.*, 2011b; Högemann, 2018). Da bei den Patienten der vorliegenden Studie die Dauer der Infektion nicht bekannt ist, sind Rückschlüsse darüber, wann im Infektionsverlauf die Schleimhaut des Respirationstraktes des Kopfes und die damit assoziierten Drüsen von Bornaviren besiedelt wurden, nicht möglich. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass diese Gewebe im Laufe einer aerogenen Infektion die Eintrittspforte für die Infektion darstellen.

Der Übertragungsweg ist auch aktuell, im Jahr 2019, noch unbekannt. Es wurde zunächst ein fäkal-oraler Weg vermutet, da Virus mit dem Kot ausgeschieden wird (De Kloet & Dorrestein, 2009; Lierz *et al.*, 2009; Rinder *et al.*, 2009a; Kistler *et al.*, 2010). Basierend auf Nachweisen von aviären Bornaviren oder ihren Antigenen in diversen Organen und dem Urin wurde zusätzlich die Übertragung über Federstaub, Urin oder Geschlechtsprodukte und eine horizontale Übertragung über infizierte Keimepithelien erwogen (Rinder *et al.*, 2009a; Lierz *et al.*, 2009; Weissenböck *et al.*, 2009a; 2009b; Löffler, 2011; Heatley & Villalobos, 2012). Allerdings gelang es bei Infektionsversuchen mit Graupapageien und Nymphensittichen (Rinder *et al.*, 2013; Heckmann *et al.*, 2017) nicht, die Tiere p. o. mit aviären Bornaviren zu infizieren, und eine vertikale Übertragung wird zwar vermutet, aber als ineffizient angesehen (Rubbenstroht *et al.*, 2014a). Eine gezielte Untersuchung der respiratorischen Schleimhaut, der olfaktorischen Schleimhaut und der assoziierten Kopfdrüsen (Hardersche Drüse, *Glandula membranae nictitantis*; Tränendrüse und Nasendrüse) zum Vorkommen von Bornaviren bei einer PDD von Papageienvögeln war bislang jedoch noch nicht erfolgt.

Die durch Bornaviren verursachte Erkrankung PDD besitzt bei Papageien große Bedeutung. Die schwere Erkrankung, die hauptsächlich den Magendarmtrakt und das zentrale Nervensystem betrifft, kann nur symptomatisch therapiert werden und endet immer letal (Ridgway & Gallerstein, 1983; Phalen, 1986; Gray *et al.*, 2010). So beurteilten Reavill & Schmidt (2007) PDD als Hauptursache der Magendarmtrakt-Auffälligkeiten bei 1640 pathologisch untersuchten Papageienvögeln. Es können unterschiedliche gastrointestinale und neurologische Symptome auftreten, und es besteht eine große Vielfältigkeit an unterschiedlich stark ausgeprägten Ausfallerscheinungen (Gancz *et al.*, 2010). In der Regel verläuft die Krankheit in Schüben und mit Phasen ohne Krankheitssymptome oder chronisch progressiv, es wurden aber auch schon Fälle bekannt, bei denen der Tod ohne vorherige Symptome plötzlich eintrat (Gancz *et al.*, 2010; Philadelpho *et al.*, 2014).

Im Zusammenhang mit der Bornaschen Krankheit der Pferde, die durch ähnliche Viren verursacht wird, wird dem olfaktorischen Epithel eine große Bedeutung zugemessen. Morales *et al.* (1988) sehen das olfaktorische Epithel als Ausgangspunkt für die Verbreitung der Bornaviren im Pferdekörper an. Richt *et al.* (1993) wiesen bei Pferden durch PCR-Untersuchungen von Abstrichen aus der Nasenhöhle sowie Speichel und Tränenflüssigkeit Bornavirus-RNA in diesen Materialien nach. Carbone *et al.* (1987) haben junge Lewis Ratten auf fünf unterschiedlichen Wegen mit BDV infiziert (intranasal, intracerebral, subkutan, intravenös und oral) und dann den Verlauf des Krankheitsausbruchs beobachtet. Die Inkubationszeit variierte zwischen 17 und 90 Tagen, abhängig von der verabreichten Viruskonzentration, wobei ein Virusnachweis im Gehirn bereits nach acht Tagen erfolgreich möglich war. Dabei wurde die intranasale Infektionsroute als genauso effektiv erachtet wie der intracerebrale Infektionsweg.

Bei Papageienvögeln wurde Bornavirus-Antigen im Ziliarkörper des Auges nachgewiesen, der an der Produktion der Kammerwasserflüssigkeit beteiligt ist (Löffler, 2011). In einer kürzlich publizierten Studie von Leal de Araujo *et al.* (2017) wurden Bornaviren oder typische Veränderungen in nicht näher differenzierten oder beschriebenen Schleimhäuten von Kopfhöhlen bei

Nymphensittichen, die experimentell intramuskulär in den Brustmuskel infiziert worden waren mittels Histopathologie und Immunhistochemie nicht nachgewiesen.

Untersuchungen zum Nachweis von PaBV in den Schleimhäuten der Nasenhöhlen und der assoziierten Drüsen bei infizierten oder an PDD erkrankten Papageienvögeln fehlten also noch nahezu vollständig. Es wurde daher in der vorliegenden Studie untersucht, ob und in welchen Zellen Virusantigen mittels IHC nachgewiesen werden kann und ob sich hier pathohistologische Veränderungen zeigen. Für diese Untersuchung wurden natürlich mit Bornaviren infizierte Papageienvögel einbezogen, die aufgrund unterschiedlicher Gründe, aber unabhängig von der vorliegenden Studie, aus Tierschutzgründen euthanasiert werden mussten oder eines natürlichen Todes gestorben waren.

Ein positiver Bornavirusnachweis, der durch diverse Untersuchungsmethoden erbracht wird, zieht nicht zwangsläufig auch eine sofortige Indikation zur Euthanasie des betroffenen Vogels nach sich (Gregory *et al.*, 2000; De Kloet & Dorrestein, 2009). Aktuell ist zwar noch keine kausale Therapiemöglichkeit bekannt, so dass auch aufgrund der persistierenden Infektion von einer Mortalitätsrate bis zu 100 % ausgegangen werden muss. Es stehen jedoch symptomatische und palliative Behandlungsmöglichkeiten zur Verfügung (Gancz *et al.*, 2012). Einige infizierte Tiere können mit einer unterstützenden Therapie noch Jahre mit guter Lebensqualität überleben. Aus all diesen genannten Gründen war bei den in dieser Studie einbezogenen natürlich infizierten Papageienvögeln der Zeitpunkt der Infektion nicht bekannt und auch nicht herleitbar. Generell empfiehlt sich aus klinischer Sicht, Vögel mit nachgewiesener PaBV-Infektion allein oder in Gruppenhaltung mit anderen infizierten Vögeln zu halten, keineswegs jedoch eine Neuvergesellschaftung mit unverdächtigen Tieren.

In der vorliegenden Studie wurde bei den Papageienvögeln die Diagnose einer Bornavirus-Infektion durch molekulargenetische Untersuchungsverfahren aus Blutproben und Gewebeproben gestellt, in der Regel aus einer Kombination von ELISA (nicht durchgeführt bei den Vögeln #34349, #37676, #37929 und #38763) und PCR-Untersuchungen (real-Time-PCR und konventionelle PCR). Dabei wurde bei neun Vögeln PaBV-4 nachgewiesen (#118, #7044, #18784, #27144, #29960, #33402, #33404, #34349 und #37676) und bei fünf Vögeln PaBV-2 (#20847,

#30215, #37929, #38763 und #45040). Beide Viren gehören zu der Spezies *Psittaciform 1 Orthobornavirus*.

Bei der anschließend durchgeführten immunhistologischen Untersuchung wurde im respiratorischen Epithel bei einigen der in der Studie verwendeten infizierten Vögel Bornavirus-Protein nachgewiesen. Dabei lag bei den Vögeln eine sehr unterschiedlich ausgeprägte Intensität der positiven Färbung vor, sowohl im Bezug auf die Anzahl der befallenen Zellen im Präparat als auch in der Ausprägung der Braunfärbung. Über die Ursache für die unterschiedlich starke Farbreaktion kann nur spekuliert werden. Wahrscheinlich besteht ein Zusammenhang mit der im Gewebe vorkommenden Antigenkonzentration. Die beiden Vögel #20847 und #38763, bei denen die Farbreaktion am stärksten ausgeprägt war, waren mit PaBV-2-Viren infiziert. Da jedoch andere Träger des gleichen Virus auch schwächere Farbreaktionen lieferten, scheint ein Zusammenhang mit dem infizierenden Virus (PaBV-2 oder -4) nicht gegeben zu sein. Die Braunfärbung der Kinozilien des respiratorischen Epithels ist vermutlich ein Artefakt und spiegelt eine unspezifische Bindungsreaktion wider, da diese auch bei in der PCR negativ auf Bornavirus-RNA untersuchten Vögeln regelmäßig auftrat. Ob dies mit den feinen Zilien-Strukturen dieser Zellen zusammenhängt, sich dort das DAB auch ohne Antikörperkomplex anhaftet, kann nur spekuliert werden.

Bei vielen untersuchten Vögeln zeigte sich ein positiver PaBV-N-Antigennachweis in den hochprismatischen Epithelzellen und den aufsitzenden Kinozilien (#7044, #20847, #27144, #37676, #38763, #37929). In Endothelzellen war ebenfalls bei mehreren untersuchten Vögeln ein PaBV-N-Antigennachweis (#7044, #20847, #38763) möglich. Muköse Drüsen (#20847, #38763), Fibrozyten (#20847, #38763), Chondrozyten (#38763, #37929) und Erythrozyten (#27144) waren nur vereinzelt bei wenigen untersuchten Vögeln positiv angefärbt. Bei einem Vogel zeigte sich im respiratorischen Epithel nur dezente Anfärbung der Kinozilien der Epithelzellen (#118), die wie bereits erwähnt, jedoch kritisch betrachtet werden muss, da sich die Kinozilien auch bei negativ auf Bornaviren getesteten Tieren angefärbt haben.

Bei dem mit PaBV-2 infizierten Kongo-Graupapagei #38763 wurde auch das olfaktorische Epithel histologisch dargestellt. Im Bereich dieses olfaktorischen

Epithels konnte großflächig in den beteiligten Zelltypen (Sinneszellen, Stützzellen, Basalzellen) eine positive Färbung im Zytoplasma und auch in einigen Zellkernen dargestellt werden. Zusätzlich stellten sich bei diesem Tier auch Einlagerungen von dunklen Pigmenten dar. Es war außerdem eine sehr starke Anfärbung der Zellen des in dieser Region austretenden Riechnervenstranges zu erkennen. Am Randbereich des Nervengewebes im Übergang zum olfaktorischen Epithel und auch in zentralen Bereichen des olfaktorischen Epithels waren dunkle Pigmente sichtbar, die auch schon in der HE-Färbung aufgefallen waren. Ob diese Pigmentierung eine individuelle Anomalie darstellt, kann nicht sicher beurteilt werden. Das olfaktorische Epithel von Kongo-Graupapagei #45040, der ebenfalls mit PaBV-2 infiziert war, wies solche Pigmenteinlagerungen nicht auf. Zur Klärung der Relevanz dieses Befundes müsste das olfaktorische Epithel weiterer Kongo-Graupapageien und anderer Papageienvögel untersucht werden.

Leal de Araujo *et al.* (2017) berichten bei Bornavirus-infizierten Nymphensittichen von einer zügigen Ausbreitung der Bornaviren vom Infektionsort in das zentrale Nervensystem und dann erst in einer späteren Phase in weitere Gewebe, die Versuchsnymphensittiche der Studie wurden nach spätestens 114 Tagen p. i. euthanasiert. In der vorliegenden Studie wurden Tiere aufgenommen, bei denen der exakte Infektionszeitpunkt unbekannt war. Einige Papageien waren bereits jahrelang molekularbiologisch nachgewiesen mit Bornaviren infiziert. Die Sinneszellen im Riechepithel werden permanent erneuert, sie sind Nervenzellen mit großem Regenerationspotential (Seeger *et al.*, 2010). Daher ist nicht auszuschließen, dass nicht alle im Rahmen der Regeneration entstandenen Sinneszellen mit Bornaviren infiziert werden oder dass sich Virus-Protein in ihnen konzentriert. In anderen Studien ist Nervengewebe, vor allem das Gehirn, das Gewebe, in dem zuverlässig ein Virusnachweis erfolgen kann (Carbone *et al.*, 1987; Morales *et al.*, 1988; Krautz, 2015; Leal de Araujo *et al.*, 2017).

In der vorliegenden Studie konnte mittels immunhistochemischer Färbung in der Nasendrüse, und zwar in serösen Endstücken (#37929, #18784), den Zylinderzellen der Ausführungsgänge (#18784) und dem Interstitium des Drüsenkörpers (#118, #18784) ein PaBV-N-Antigennachweis erfolgen. Kein positives Ergebnis erbrachten drei Vögel (#37676, #38763, #45040). Die Zeitspanne zwischen der

Diagnosestellung einer Bornavirus-Infektion und dem Tod des Tieres, die allerdings nicht mit der Infektionsdauer gleichgesetzt werden kann, betrug bei der Blaustirn-Amazone #18784 1,75 Jahre, bei den Vögeln #37676, #37929, #38763 und #45040 maximal einen Tag. Eventuell liegt hier also in der Länge der bestehenden Infektion der Schlüssel zu den unterschiedlichen Darstellungen. Für eine fundierte Aussage sind die Tierzahlen jedoch zu gering und die Vergleichbarkeit aufgrund der verschiedenen Viren (PaBV-2 und PaBV-4) und die fehlenden Informationen zur Infektion (z. B. Infektionszeitpunkt oder -dauer, Infektionsweg, Virusmenge) zu unsicher.

In der Tränendrüse der untersuchten Vögel konnte in den Epithelzellen (#7044, #20847) der Azini und den Drüsenzellen (#7044) Virusantigen dargestellt werden. Kein Nachweis von PaBV-N-Antigen in der Tränendrüse konnte bei zwei Vögeln (#29960, #37929) erfolgen. Der Virustyp scheint auch hier nicht relevant für die Intensität der Infektion der Zellen des Gewebes zu sein, denn bei den Vögeln mit positiver Antigenfärbung wurde PaBV-2 bzw. PaBV-4 nachgewiesen, ebenso waren beide Virustypen bei den Vögeln ohne erfolgreichen Nachweis von PaBV-N-Antigen vertreten.

Bei der immunhistochemischen Untersuchung der Harderschen Drüsen gelang nur selten ein Nachweis von Bornavirus-Antigen im Drüsengewebe. Da die *Glandula membranae nictitantis* einen wichtigen Teil des Immunsystems der Vögel darstellt (Burns, 1976; Neumann & Kaleta, 1977; Ohshima & Hiramatsu, 2002), war von großem Interesse, ob auch Bornaviren hier nachgewiesen werden können.

Hauptsächlich im Interstitium der Drüse war PaBV-N-Antigen nachweisbar (#118, #20847, #27144), in den Azini waren nur vereinzelt Zellkerne braun angefärbt (#118, #20847, #27144), während nur bei einem Vogel das Zellplasma in den Azini angefärbt war (#118). Bei dem Prachttrosella #29960 konnte kein Nachweis von PaBV-N-Protein erfolgen. Allerdings wurde bei diesem Vogel ein Virusbefall nur im Gehirn festgestellt. Der Nachweis von Bornavirus in der Harderschen Drüse eines Kongo-Graupapageien gelang in dieser Studie nicht. Im Gegensatz zu den anderen untersuchten Geweben der vorliegenden Studie schien somit ein Nachweis von Bornaviren in der Harderschen Drüse nur selten möglich. Ein positiver Nachweis konnte trotz molekulargenetisch nachgewiesener Infektion nur bei

wenigen Tieren der Studie erfolgen. Es könnte ein Zusammenhang mit der Sekretionsleistung der Drüse bestehen, da sie als Teil des Tränenapparates beim Vogel sehr produktiv ist und somit stetig zahlreiche zelluläre Prozesse ablaufen, in denen Zellmaterial ausgeschieden wird. Durch die geringe Anzahl der untersuchten Papageienvögel könnte es sich bei dem Ergebnis aber auch um einen Zufallsbefund handeln, der nicht repräsentativ ist. In der Harderschen Drüse könnte eventuell die Zeitdauer der Infektion der Papageienvögel für einen erheblichen Unterschied in der Darstellbarkeit verantwortlich sein. So wurde bei Vögeln mit langer Infektionsdauer, belegt durch eine lange, oft jahrelang nachgewiesene Infektion (Abstand zwischen Diagnosestellung und Tod des Tieres) Antigen in der Drüse dargestellt (Vögel #118, #20847, #27144). Bei Vögeln, bei denen nur wenige Tage ein positiver Virusnachweis vorlag, wie bei #29960, #33402, #34349, #37676 und #38763, ergaben die immunhistochemischen Färbungen jedoch keinen positiven Befund. Da bei den Vögeln mit nur kurzer nachgewiesener Mindestinfektionsdauer trotzdem eine längere Infektionsdauer nicht ausgeschlossen werden kann, ist diese Erklärung allerdings spekulativ. Ob auch ein Nachweis von Antikörpern gegen Bornaviren aus der Tränenflüssigkeit, wie bei Versuchen mit Hühnern gegen andere Viruserkrankungen nachgewiesen wurde (Neumann & Kaleta, 1977; Mansikka *et al.*, 1989; Cors, 2013), erfolgen kann, müssen weitere Untersuchungen zeigen. Interessant wäre hierbei auch, ob die nachweisbare Antikörpermenge von der Befallsrate der Drüsenzellen der Harderschen Drüse beeinflusst wird.

Bei Einbeziehung der Ergebnisse von Leal de Araujo *et al.* (2017), die kürzlich bei Nymphensittichen (*Nymphicus hollandicus*) den zunächst neurotrophen Weg der Bornaviren und eine erst nach längerer Infektionszeit erfolgende Verteilung in andere Gewebe nachgewiesen haben, könnte vermutet werden, dass die Infektion der Harderschen Drüse erst am Ende der Infektionsausbreitungskette im Körper angesiedelt ist.

Bornaviren gelten als nicht zytopathogen, wie bereits von Rinder *et al.* (2009a) und Raghav *et al.* (2010) veröffentlicht wurde. Diese Ansicht bestätigend konnten auch in der vorliegenden Arbeit bei den infizierten Zellen keine signifikanten pathologischen Veränderungen nachgewiesen werden. Einzelne, auf Zellebene festgestellte histopathologische Veränderungen in den untersuchten Geweben waren mit autolytischen Vorgängen am Tierkörper in Verbindung zu bringen und

zu erklären oder leiteten sich von der Vorerkrankung, die zur Euthanasie aus Tierschutzgründen geführt hatte, ab.

In einzelnen Fällen wurden in den Geweben entzündliche Veränderungen beobachtet, die nicht mit dem Nachweis von Virusantigen kolokalisiert waren, ähnlich wie es von den im Rahmen der PDD beschriebenen Veränderungen in anderen Geweben, zum Beispiel dem Magen-Darm-Trakt bekannt ist (Löffler, 2011; Wünschmann *et al.*, 2011). Entzündungsreaktionen können infolge einer Vielzahl von unterschiedlichen Reizen auftreten, sie sind nicht als eine spezifische Reaktion auf eine Bornavirus-Infektion anzusehen. Im Folgenden werden bei einzelnen Vögeln beobachtete Veränderungen beschrieben, bei denen ein Kausalzusammenhang mit der Bornavirus-Infektion allerdings in der vorliegenden Studie nicht nachweisbar ist.

Im respiratorischen Epithel von dem PaBV-infizierten Hybridara #118 wurde eine größere Ansammlung von Leukozyten in der *Lamina propria mucosae* dargestellt (Abb. 12), gleiches galt jedoch auch für die Venezuela-Amazone #32270 (Abb. 8b, c), die nicht infiziert war. Rupturen von Gefäßwänden zeigten nur die nicht-infizierten Vögel #34580 und #36854 (Abb. 2b, 13a, b, c).

Im olfaktorischen Epithel waren die *Glandulae olfactoriae* bei dem PaBV positiven Kongo-Graupapagei #38763 lytisch verändert, zusätzlich stellte sich im Randbereich des Nervengewebes des Riechnervs am Übergang ins olfaktorische Epithel und im zentralen Bereich des olfaktorischen Epithels dunkles Pigment dar (Abb. 26b, c). Davon wurde jedoch noch nie im Zusammenhang mit einer PaBV-Infektion berichtet, der ebenfalls infizierte Kongo-Graupapagei #45040 zeigte diese Pigmentierung nicht, auch nicht der Schwarzohrpapagei #34789 und der Nymphensittich #36539, die nicht mit Bornaviren infiziert waren.

In der Nasendrüse konnten bei der Blaustirn-Amazone #37676 lymphatische Zellen im Drüseninterstitium dargestellt werden (Abb. 20d). Die Nasendrüse der anderen beiden PaBV-infizierten Papageienvögel #118 und #34349 wiesen ausschließlich Gewebeveränderungen auf, die durch Autolyse erklärt werden konnten.

In der Harderschen Drüse konnte oftmals eine Ansammlung von lymphatischen Zellen, hauptsächlich im Bereich um die Sammelgänge, in den Präparaten

dargestellt werden (#32828, #34424, #34789, #38035, #38435). Neben den nicht infizierten Vögeln war dies auch bei dem PaBV positiv getesteten Hybridara #118 und dem Kongo-Graupapagei #38763 der Fall (Abb. 40c, d; 42b).

Wie bereits erwähnt, gelten die in dieser Studie nachgewiesenen lymphoplasmazytären Infiltrate jedoch nicht als ausschließlich durch das Vorkommen von Bornaviren bedingt (Rinder *et al.*, 2009a; Raghav *et al.*, 2010). Dies wird in den dargestellten Ergebnissen auch durch das Vorkommen bei nicht mit PaBV infizierten Vögeln unterstützt. In der Harderschen Drüse sind Lymphozyten und Plasmazellen zusätzlich physiologisch und daher ist eine vermehrte Ansammlung nur schwer zu beurteilen.

Am häufigsten wurden in den Geweben der untersuchten Vögel lytische Veränderungen gefunden oder Gewebeschäden, die vermutlich aufgrund der Vorerkrankungen, die zur Euthanasie der Vögel geführt hatten, entstanden sein könnten. Präparate, die zu stark zerstört bzw. verändert waren, wurden nicht weiter in die Auswertung mit einbezogen.

Im Bezug auf die Rolle der mit der respiratorischen Schleimhaut des Kopfes assoziierten Drüsen bei der Infektion mit Papageien-Bornaviren wäre es interessant, weiterführende Untersuchungen zur Immunität durchzuführen. Hier könnte untersucht werden, ob und wann sich nach der Infektion (auf unterschiedlichen Wegen - konjunktival, nasal, intravenös, intracranial- mit unterschiedlichen Viren und Virusstämmen) erstmals Antikörper in der Tränenflüssigkeit nachweisen lassen, welcher Klasse sie angehören und wie lange sie ausgeschüttet werden.

Mittels Immunhistochemie und zusätzlich mittels RT-PCR wurde in der Vergangenheit Bornavirus-Antigen bzw. -RNA in zahlreichen Geweben (Sehnerv, Auge, Kropf, Drüsenmagen, Muskelmagen, Duodenum, Lunge, Leber, Pankreas, Milz, Herz, Niere, Schilddrüse, Knochenmark, Gefäßwände, Gonaden, Muskel, Haut/ Federn, Knorpel, Gehirn, Rückenmark und Kleinhirn) von Papageien nachgewiesen (Löffler, 2011). Wie in der vorliegenden Studie wurden dabei aber nur natürlich infizierte Papageien einbezogen, sodass Rückschlüsse auf die Ausbreitung der Viren im Körper nicht möglich sind. Zur Ausbreitung von Bornaviren bei Papageienvögeln liegt erst eine systematische Studie vor. In einer neueren Studie von Leal de Araujo *et al.* (2017) ergab sich bei einer experimentellen

Infektion von Nymphensittichen (*Nymphicus hollandicus*) mit PaBV-2 in den *Musculus pectoralis* und einer maximalen Beobachtungsdauer von 114 Tagen Hinweise darauf, dass die Viren zunächst über Nerven in das ZNS einwanderten und anschließend in weitere Organe verbreitet wurden. Der erste positive Virusnachweis erfolgte nach 20 Tagen in den Schwann-Zellen des Brachial-Plexus und im ventralen Horn des thorakalen Segments des Rückenmarks, erst nach 25 Tagen war das PaBV-2 in die Graue Substanz und die Meningen des Gehirns gelang. Der Weg dorthin wurden von den Bornaviren über die interkostalen und pectoralen Nerven sowie den *Plexus brachialis* und das Rückenmark zurückgelegt. Von dort aus erfolgte eine Ausbreitung über die sympathischen und parasympathischen Wege in die Ganglien der Organe und erst ab dem 80. Tag nach der Infektion waren auch nicht-neuronale Gewebe betroffen. Dagegen war an der Infektionsstelle ab dem 100. Tag kein Bornavirusnachweis mehr möglich. Daher liegt der Verdacht nahe, dass die Bornaviren, wie auch das Tollwut-Virus, über retrograden axonalen Transport im Körper verbreitet werden. Es wurden auch die Kopfhöhlen histopathologisch und immunhistochemisch untersucht und kein Nachweis von Veränderungen des Gewebes oder von Virusantigen erbracht (Leal de Araujo *et al.*, 2017). Diese Ergebnisse würden die Auffassung stützen, dass eine Besiedelung der Schleimhäute des Kopfes und der assoziierten Drüsen erst im späteren Verlauf der Infektion erfolgt.

In der vorliegenden Studie wurde eine Infektion des respiratorischen Epithels bei fast allen PaBV-positiven Vögeln nachgewiesen, während die Drüsen nur bei Vögeln mit bekannt lange vorliegender Infektion PaBV-Antigen-Reaktivität enthielten. Dies würde also eine Beteiligung des Epithels auch in frühen Phasen der Infektion nicht ausschließen.

Ein unbekannter Faktor durch die natürlich erfolgten Infektionen der Tiere, der daher nicht bewertet werden kann, ist der genaue Infektionszeitpunkt der untersuchten Vögel dieser Studie mit den Bornaviren. Daher ist, bis auf den Kongo-Graupapagei #33404, der besonders engmaschig kontrolliert wurde, unbekannt, wie lange die untersuchten Vögel bereits infiziert waren. Ebenso kann keine Aussage zur Virusmenge getroffen werden, mit der die Infektion erfolgte und zusätzlich ist der Weg der Viruseintragung in die Papageienvögel unbekannt, somit auch das

Gewebe, welches zuerst mit Bornaviren infiziert wurde. Die Papageienvögel, die in dieser Untersuchung die am längsten nachgewiesene Mindestinfektionsdauer aufwiesen, waren der Hybridara #118, der Kongo-Graupapageien #7044 (*Psittacus erithacus*) und die Kuba-Amazone #20847 (*Amazona leucocephala*). Bei den anderen Papageienvögeln, die in die vorliegende Studie aufgenommen wurden, lagen häufig nur rudimentäre Informationen zur Krankengeschichte vor.

Experimente zur nasalen Infektion mit Bornaviren und anschließender Ausbreitung der Viren wurden bislang nur an Ratten unter Verwendung von BoDV-Virus veröffentlicht. Morales *et al.* (1988) konnten einen axonalen Transport von BoDV nachweisen. Die Tiere wurden p. o. und nasal infiziert und vom 6. bis 20. Tag p. i. konnte histologisch in der Nasenhöhle in einzelnen olfaktorischen Rezeptorzellen Bornavirus nachgewiesen werden (Morales *et al.*, 1988). Im *Bulbus olfactorius* konnte in dieser Zeit ebenfalls nur in einzelnen Zellen ein Nachweis von BoDV erfolgen. Im olfaktorischen *Cortex* konnte ab Tag 13 p. i. großflächig und mit steigender Intensität BoVD nachgewiesen werden. Die Untersuchungen endeten jedoch ab dem 27. Tag p. i., sodass keine Langzeitstudien über das Vorkommen der Viren in diesen speziellen Gewebeteilen existieren.

Shankar *et al.* (1992) konnten nach experimentellen, intranasalen Infektionen von sechs Wochen alten Lewis Ratten mittels PCR die Ausbreitung des Borna-Disease Virus im Gehirn dokumentieren. Im *Bulbus olfactorius* erfolgte am 6. Tag nach der Infektion der erste Nachweis von RNA-Material des 38-kDa-Proteins, das spezifisch für Bornaviren ist. Bereits 14 Tage nach der Infektion wurde auch im restlichen Gehirn Virusmaterial des Borna Disease Virus nachgewiesen und erst nach 26 Tagen, also später als im Gehirn, auch in der Nasenschleimhaut sowie in Auge und Gesichtshaut. Histologische Veränderungen konnten erstmals 14 Tage nach der Infektion nachgewiesen werden, hier zeigte sich eine geringe Infiltration von mononukleären Zellen in den Meningen des rostralen Großhirns. Perivaskuläres Cuffing und Nekrosen in *Bulbus olfactorius* und dem rostralen *Cerebrum* waren am 26. Tag am stärksten vorhanden, aber wenig ausgeprägt, während sie am 38. und 60. Tag sogar zurückgegangen waren (Shankar *et al.*, 1992). Trotz des frühen Virusnachweises nach sechs Tagen im *Bulbus olfactorius* zeigten die infizierten Ratten erst nach ca. 20 Tagen Krankheitssymptome (Shankar

et al., 1992). Da die Tiere in experimentellen Versuchen häufig nach kurzer Zeit getötet werden, sind Langzeituntersuchungen bislang wenig publiziert. Diese Studie stützt aber die Auffassung, dass das BoDV sich vom Gehirn in die Nasenschleimhaut ausbreitet.

Infektionsstudien mit Bornaviren zur Erfassung der Virusausbreitung im Körper wurden in der Vergangenheit, wie beschrieben, hauptsächlich an Ratten unter Verwendung des Borna Disease Virus durchgeführt, der Nachweis wurde meist über molekulargenetische Methoden erbracht. Ob die dort gewonnenen Erkenntnisse im Detail auf die Bornaviren bei Papageien übertragbar sind, ist aktuell jedoch noch unklar.

Labormethoden

In der vorliegenden Studie sollten Papageienvögel mit und ohne nachgewiesene Infektionen mit Bornaviren untersucht werden. Die Bornavirus-Infektion sollte auf natürlichem Weg erworben sein, und ein weiteres wichtiges Einschlusskriterium war, dass der Erhaltungszustand des Vogels für eine histologische Bewertung der Gewebe ausreichte, also die Autolyse des Tierkörpers noch nicht zu weit fortgeschritten war. Es stellte dabei insbesondere bei den Bornavirus-infizierten Patienten eine große Herausforderung dar, Vögel zu akquirieren, bei denen aufgrund eines schlechten Allgemeinbefindens nach erfolgloser symptomatischer Therapie aus tierschutzrechtlicher Sicht Euthanasie angeraten werden musste, und zwar von TierärztInnen, die an der vorliegenden Studie nicht beteiligt waren. Außerdem mussten die Tierbesitzer nach der Euthanasie den Tierkörper für die Studie zur Verfügung stellen. Vor allem die großen Papageienvögel sind in der Anschaffung und Haltung sehr teuer, zusätzlich können sie ein hohes Lebensalter erreichen. Daher stellen diese Vögel für die Tierbesitzer häufig ein hochgeschätztes Familienmitglied dar, das sie auch nach dessen Ableben ungern für Forschungszwecke zur Verfügung stellen (persönliche Erfahrung).

Bei 17 der einbezogenen Vögel handelte es sich allerdings um Papageienvögel, die eines natürlichen Todes verstorben, also tot aufgefunden wurden, und dann einer Sektion unterzogen wurden. Bei den Papageienvögeln, die mit PaBV infiziert

waren, waren dies der Hybridara #118, die Kuba-Amazone #20847, die Blaustirn-Amazone #37676, die Kongo-Graupapageien #37929 und #38763. Nicht mit Bornaviren infizierte Vögel, die tot aufgefunden wurden, waren der Rostkappenpapagei #30010, der Schwarzohrpapagei #34789, die Kongo-Graupapageien #36243 und #36880, die Nymphensittiche #31268 und #36618, der Erzlori #36790, der Sperlingspapagei #37453, der Stellalori #38044, der Grüne Kongo #38159, die Blaustirn-Amazone #43830 und der Rosa Kakadu #38871. Nur Tierkörper mit scheinbar ausreichend gutem Erhaltungszustand wurden weiter untersucht und mit Gewebeproben in die Studie einbezogen.

Von einer Bornavirus-Infektion sind bei den gehaltenen Ziervögeln hauptsächlich größere Papageienarten aus den Familien Psittacidae und Cacatuidae betroffen, vor allem Aras (*Ara* sp.), Amazonen (*Amazona* sp.), Kongo-Graupapageien (*Psittacus erithacus*), Kakadus (*Cacatua* sp.), Nymphensittiche (*Nymphicus hollandicus*) und viele andere Sittiche (z. B. *Aratinga* sp.) (Gancz *et al.*, 2010). Für die hier vorliegende Studie wurden 130 verschiedene Papageienvögel (Tabelle 1) untersucht. Da ein wichtiges Ziel der Studie in einer Beschreibung des physiologischen Zustandes des schleimhaut-assoziierten Drüsensystem des Kopfes von Papageien bestand, wurden auch 72 Wellensittiche (*Melopsittacus undulatus*) einbezogen, obwohl bei diesen Vögeln bislang noch kein Nachweis von Bornaviren gelungen ist (Reavill & Schmidt, 2007; Tizard *et al.*, 2013). Auch in dieser Arbeit lieferte keiner der untersuchten Wellensittiche ein positives Ergebnis im ELISA oder in der PCR. Wellensittiche sind die in Deutschland am häufigsten gehaltenen Papageienvögel und stellen einen erheblichen Anteil der Ziervogelpatienten in der Klinik für Vögel, Kleinsäuger, Reptilien und Zierfische der Ludwig-Maximilians-Universität München (München, Deutschland) dar (Daten dazu nicht dargestellt).

Da die zu untersuchenden Strukturen sehr empfindlich für postmortal auftretende autolytische Vorgänge sind, war einer der ersten Problemfaktoren die Zeit. Dies galt sowohl für die Papageienvögel, die mit PaBV infiziert waren, als auch für Vögel, die an anderen Erkrankungen verstarben. Teilweise wurden schwer kranke Vögel in der Klinik stationär aufgenommen, bei denen mit diversen diagnostischen und therapeutischen Maßnahmen versucht wurde, die starken Krankheitssymptome der PDD, wie Krämpfe oder Erbrechen, zu lindern und eine Besserung des

Allgemeinzustandes zu bewirken. Doch manchmal verstarben die Tiere trotz dieser intensiven Betreuung. Der Zeitfaktor, bis die Besitzer kontaktiert, die Nachricht vom Tod ihres Vogels überbracht und ihr Einverständnis zur Überlassung des Tierkörpers für Forschungszwecke eingeholt worden war, konnte Stunden, in ungünstigen Fällen Tage dauern. Häufig lieferten diese Tierkörper dann trotz Kühlung keine auswertbaren histologischen Ergebnisse mehr. In Einzelfällen, wie bei Kongo-Graupapagei (*Psittacus erithacus*) #34349 konnten aber auch hier noch gute Ergebnisse erzielt werden. Im Gegensatz dazu konnten bei einigen Vögeln, die innerhalb von 15 Minuten nach ihrem Tod in die Pathologie überführt und die Gewebeproben entnommen worden waren, nur desolate histologische Befunde erhoben werden. Es scheinen also mehrere Faktoren die Erhaltung der Gewebe zu beeinflussen. Hierzu zählen extreme Temperaturen oder ein direktes Trauma, die zu einem unmittelbaren Zelltod führen können (Myers & McGavin, 2009). Der somatische Tod eines Tieres leitet umgehend die postmortale Autolyse ein, den Tod aller Körperzellen. Während Neurone und Herzmuskelzellen innerhalb von Minuten irreversible Schäden nehmen können, können Nieren- und Leberzellen eine Stunde, Fibroblasten und Knochengewebe noch weitaus länger überleben (Myers & McGavin, 2009). Die Entstehung und Entwicklung postmortaler Veränderungen variiert stark je nach Todesursache, Umgebungs- und Körpertemperatur, sowie der mikrobiellen Besiedlung der Gewebe. Eine rasche Abkühlung des Tierkörpers auf 5°C wird empfohlen, vom Einfrieren wird allerdings wegen der Gewebeschäden durch die Eiskristallbildung abgeraten (Myers & McGavin, 2009). Grundsätzlich bleibt aber zu sagen, dass eine Entnahme von histologischem Material stets so schnell wie möglich erfolgen sollte, um eine Autolyse zu vermeiden. Lang (2006) gibt für Gewebe, das später immunhistochemisch gefärbt werden soll, eine Zeitspanne von 30 Minuten an, bis es in Fixanz verbracht worden sein soll.

Die Wahl des Fixationsmediums fiel auf das Zamboni-Medium, welches sich aus Paraformaldehyd, Sörensenpuffer und 1,3 % Pikrinsäure zusammensetzt, da einerseits der Erhalt des Gewebes gut war und es, im Gegensatz zu gepuffertem 3,7%igem Formalin, antigenschonende Eigenschaften besitzt (Lang, 2006), die vor allem für die später erfolgte Immunhistochemie relevant waren. Auch das Gewebe von Papageienvögeln, die nicht im Verdacht standen, an PDD erkrankt zu sein,

wurde in Zamboni fixiert. Durch dieses Vorgehen sollte die Vergleichbarkeit gewährleistet bleiben, da Pikrinsäure eine starke Schrumpfung der Gewebe verursacht (Lang, 2006).

Eine mögliche Ursache für die Tatsache, dass nur in den seltensten Fällen die Hardersche Drüse separat isoliert werden konnte, war die bei vielen einbezogenen Papageienvögeln beobachtete Adipositas. Durch eine häufig nicht artgerechte, also zu energiereiche, Ernährung und Bewegungsmangel sind viele gehaltene Vögel fettleibig, und daher ist auch das retrobulbäre Fettgewebe vermehrt. Eine Unterscheidung von Fettgewebe und Harderscher Drüse war allerdings häufig makroskopisch nicht möglich, bzw. die auf Verdacht entnommenen Gewebestücke waren in der Histologie nur als Fettzellen zu identifizieren. Daher wurde stets versucht, die *Glandula membranae nictitantis* in den eingebetteten, leeren, knöchernen Augenhöhlen während der histologischen Aufarbeitung zu lokalisieren. Durch die vorherige Bulbusentnahme für ein anderes Projekt konnte die physiologische Lage nicht erhalten bleiben, jedoch konnte auf diese Weise bei mehreren Vögeln das gesuchte Drüsengewebe so dargestellt werden.

Der Entkalkungsvorgang der Schädel war ebenfalls anspruchsvoll. Vor allem bei sehr großen Vogelarten, wie zum Beispiel Gelbbrustaras, aber auch bei einigen kleinen Amazonen, und je nach individuellem Kalzifizierungszustand der Knochen war die Schädelkapsel meist sehr hart. In der Regel war bei den größeren Vögeln dieser Studie eine Eröffnung der Schädelkapsel nur mit einem Messer nicht möglich. Daher wurde in solchen Fällen eine oszillierende Säge verwendet, der Hersteller verspricht bei diesem Gerät Gewebeschonung. Da makroskopisch nicht beurteilt werden konnte, ob zusätzlich zum mechanischen Schaden an den Kontaktstellen eine Veränderung des Gewebes auf Grund von thermischen Veränderungen durch die Temperaturentwicklung beim Sägevorgang hinzu kam, wurde nach dem Sägen vor der Einbettung eine dünne Scheibe des Präparates an der Schnittstelle entfernt.

Der Entkalkungsprozess konnte erheblich beschleunigt werden, wenn das zu entkalkende Präparat mit der Entkalkerflüssigkeit in einen Wärmeschrank verbracht wurde. Es erwies sich als günstig, wenn bei 40 °C das EntkalkermEDIUM

mindestens einmal täglich erneuert wurde, besser und schneller zum Ziel führte allerdings der Wechsel zweimal täglich.

Bei der Laborarbeit kann sich durch die richtige Verarbeitungstechnik viel Zeit und Material gespart werden. In einem Vortest wurden die Blöcke blind geschnitten, dass heißt der Block wurde abgetragen bis zum großflächigen Gewebeanschnitt und dann zehn Schnitte angefertigt. Von diesen Schnitten wurde Schnitt eins, vier, sieben und zehn standardmäßig mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Diese wurden nach Trocknung betrachtet und festgestellt, ob das in diesem Block zu vermutende Gewebe aufgefunden wurde oder nicht. Falls nicht, wurden von dem Block nach einem Abtrag von zehn Schnitten à 10 µm wieder zehn Schnitte à 4 µm angefertigt und wiederholt vier Schnitte gefärbt. Dieses Verfahren erwies sich als äußerst material- und zeitaufwendig. Zeit- und materialsparender ist es, das gesuchte Gewebe auch ungefärbt unter einer Lupe zu erkennen, was bei drüsigem Gewebe und Schleimhautbesatz gut umsetzbar ist. Sicherlich ist dies jedoch nicht für alle gesuchten Organe anwendbar, wenn diese ohne eine besondere Behandlung nicht zuverlässig von den umgebenden Gewebestrukturen unterschieden werden können.

Vor allem bei Weichgewebe und Objekten, die flächenmäßig nur eine kleine Kontaktoberfläche auf dem Objektträger bilden, ist eine besonderen Behandlung der Objektträger unter Umständen sinnvoll, um ein Abschwemmen der Schnitte bei der späteren Färbung zu verhindern. Zunächst ist es immer empfehlenswert, die Schnitte auf SuperFrost-Plus® Objektträger aufzuziehen. Da diese jedoch im Vergleich deutlich teurer als herkömmliche Objektträger sind, kann auch eine kurze indirekte Antrocknung auf dem Rand des Wasserbeckens als Option für Schnitte, die eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung durchlaufen sollen, angewendet werden. Dafür werden die aus dem Wasserbad aufgefischten Schnitte auf dem Objektträger, mit dem anhaftenden Schnitt nach oben, direkt auf den breiten, heißen Rand des Wasserbeckens aufgelegt und dort für wenige Minuten belassen. Danach werden sie zu den anderen Schnitten auf den Objektträgerständer auf die Heizplatte gestellt. In dieser Studie wurde dieses Verfahren bei den Gehirnschnitten und den Schnitten der separat entnommenen Harderschen Drüsen angewendet.

Beim Färben wurde in dieser Arbeit immer mit dem exakt gleichen zeitlichen Ablauf gearbeitet, obwohl eigentlich auch bei Hämatoxylin-Eosin-Färbung durch

manuelles Eingreifen ein Variieren und somit ein Anpassen der Farbintensität möglich ist. Durch die zeitliche Gleichförmigkeit konnte jedoch belegt werden, dass verschiedene Vögel, von denen Gewebeproben verarbeitet wurden, auch unterschiedliche Färbereigenschaften aufwiesen. Je frischer tot und somit in einem besseren Zustand fixiert, desto besser konnte die Farbe am Gewebeschnitt haften. In einer Färbeschaukel mit zehn Schnitten konnten so eventuell unterschiedlich intensive Färbungen bei verschiedenen Individuen beobachtet werden, obwohl der Ablauf und die Chemikalien exakt gleich waren. Eine schlechte Farbintensität in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung war bereits ein Hinweis darauf, dass auch die Immunhistologie eventuell keine guten Ergebnisse liefern würde.

Immunhistochemische Färbemethoden wurden aufgrund der langen Färbedauer unter extrem feuchten Bedingungen ausschließlich auf Superfrost Plus® Objektträgern durchgeführt, um ein Abschwemmen der Präparate zu umgehen. Diese Objektträger haben eine besondere Oberflächenbehandlung erfahren, um ein verbessertes Anhaften der histologischen Schnitte zu erreichen. Sie sind permanent positiv geladen und binden die Schnitte durch elektrostatische Anziehungskraft. Die Schnitte für immunhistochemische Färbungen wurden nicht zu lange im Voraus angefertigt (maximal sieben Tage) und dann auch nicht zu heiß getrocknet, da diese Technik in der Regel auf Proteinbindungen basiert, die unter Umständen sonst denaturieren. Eine gute Antrocknung erfolgte über eine Dauer von drei Tagen und bei 48 °C Trockentemperatur. Mit dieser Vorgehensweise wurden keine negativen Beeinflussungen der Präparate festgestellt.

Bei Vögeln, deren Gewebe schlechte Färbeergebnisse zeigten, wie dem Prachtrorella #29960, wurde die Einwirktemperatur des Primärantikörpers im Vergleich mit dem in der histologischen Abteilung der Klinik für Vögel, Kleinsäuger, Reptilien und Zierfische durchgeführten Färbeprotokoll variiert. Anstatt einer Inkubation über Nacht im Kühlschrank, erfolgte ein Belassen entweder zunächst für einige Zeit (1-4 Stunden) oder auch die komplette Zeit über Nacht bei Raumtemperatur. Es gab jedoch Tiere, bei denen auch dieses Vorgehen zu keinen besseren Ergebnissen in der IHC führte. Dies betraf den Prachtrorella (*Platycercus eximius*) #29960 und die beiden Kongo-Graupapageien (*Psittacus*

erithacus) #33404 und #45040, wobei die beiden Kongo-Graupapageien allerdings in gepuffertem Formalin anstatt in Zamboni-Medium fixiert wurden.

Obwohl immunhistochemische Färbungen allgemein schlechter gelingen, wenn die Präparate sehr lange entkalkt wurden, war dies in der vorliegenden Studie an den in Zamboni-Medium fixierten Vögeln in keinsten Weise zu vermerken. Die IHC auf PaBV-N-Antigen bei den formalinfixierten, in der PCR positiv auf Bornaviren getesteten Kongo-Graupapageien (*Psittacus erithacus*) #33404 und #45040 brachte trotz Einwirkdauer des Primärantikörpers von bis zu 19 Stunden bei Raumtemperatur (anstatt den üblichen 16 Stunden im Kühlschrank bei 4°C) keine Ergebnisse. Es ist möglich, dass bei diesen beiden Vögeln mit der nachgewiesenen Mindestinfektionsdauer von null bzw. einem Tag in den untersuchten Geweben kein PaBV-N-Antigen vorhanden war und die Färbung somit korrekt funktioniert hat. Trotzdem wurde testweise ein allgemeines immunhistochemisches Färbeprotokoll aus einem anderen Labor verwendet. Mit dieser Kochmethode, in Anlehnung an das Protokoll der immunhistochemischen Färbung des Anti- β -III-Tubulin-Antikörpers, gelang es, vermutlich durch den thermischen Aufschlussprozess, eine positive Braunfärbung zu erreichen. Doch diese Ergebnisse waren so stark positiv, dass eine Auswertung durch die starke Hintergrundfärbung aller Gewebe nicht für sinnvoll erachtet wurde. Aufgrund der andersartigen Behandlung der Schnitte wurden diese Präparate nicht in die Auswertung der vorliegenden Studie mit einbezogen.

Falls das erste Färbeergebnis des standardmäßig genutzten Färbeprotokolles doch falsch negativ war, begründete dies eventuell auf der Fixation in Formalin, dem einzigen Unterschied der Probenbehandlungen im Gegensatz zu den anderen Vögeln der Studie. Die IHC Färbung mit β -III-Tubulin konnten dagegen mit hervorragenden Ergebnissen an diesen beiden Tieren durchgeführt werden und damit die Nervenzellfortsätze des olfaktorischen Epithels dargestellt werden. Neben der Hypothese, dass diese Vögel in den untersuchten Geweben kein PaBV-N-Antigen aufwiesen, könnte das Bornavirusprotein eventuell fragiler oder empfindlicher sein, als andere physiologische Gewebestrukturen. Es wäre auch vorstellbar, dass der verwendete Antikörper je nach Gewebebehandlung in der

Anlagerung gehindert werden kann. Worin genau die Varianzen bestehen, kann in dieser Studie an den beiden Einzelfällen nicht beurteilt werden.

Für die Präparate, die mittels immunhistochemischer Färbung auf Bornaviren untersucht wurden, wurde stets das in der Klinik für Vögel, Kleinsäuger, Reptilien und Zierfische angewendete Protokoll verwendet, das durch Löffler (2011) für formalinfixierte Schnitte etabliert worden war. Ein Vergleich mit teilweise in vielen Aspekten sehr unterschiedlichen anderen verwendeten Färbeprotokollen (siehe Literaturteil) ist aufgrund fehlender Verfügbarkeit der anderen verwendeten Antikörper nicht möglich. Die Protokolle unterscheiden sich nicht nur in den verwendeten Primär- oder Sekundärantikörpern, sondern auch in den Puffermedien und der maximalen Temperatur, der die Schnitte bei verschiedenen Verarbeitungsschnitten ausgesetzt wurden. Eine Vergleichsstudie wäre nötig, um aus den verschiedenen Verfahren (Zusammenspiel aus Fixierungsmedium und Färbeprotokoll mit entsprechenden Reagenzien) dasjenige mit den besten und zuverlässigsten Ergebnissen zu evaluieren. Andererseits hat die vorliegende Studie aber auch gezeigt, dass auch die verschiedenen Vögel, nicht nur abhängig von ihrer Art, sondern auch als Individuum, und ihre jeweiligen Organe unter Umständen unterschiedlich reagieren und deswegen vermutlich kein allgemein gültiges Protokoll als einzig richtiges festgesetzt werden kann. Dies erschwert jedoch auch den Vergleich von Ergebnissen, die durch unterschiedliche Verfahren erbracht worden sind. Es könnten sich Unterschiede in der Bindungsfähigkeit der Erstantikörper an die PaBV-Proteine der verschiedenen Viren zeigen und Empfindlichkeiten gegen Puffermedien oder Temperaturen bei den Detektionsreagenzien auftreten.

VI. Zusammenfassung

Die physiologische Histologie der respiratorischen und olfaktorischen Schleimhaut bei Papageienvögeln und der damit assoziierten Drüsen im Kopfbereich, also der Nasendrüse, Tränendrüse und Harderschen Drüse, ist bei Papageienvögeln noch weitgehend unbekannt. Bislang wurde ebenfalls nicht untersucht, ob Bornaviren, die Erreger der bei Papageienvögeln bedeutenden Erkrankung der Neuropathischen Drüsenmagendilatation, diese Gewebe infizieren, wie es bereits für das Borna Disease Virus bei Säugetieren nachgewiesen wurde. In der vorliegenden Arbeit sollte daher zunächst die physiologische Histologie dieser Strukturen bei einem möglichst breiten Artenspektrum innerhalb der Ordnung Papageienvögel beschrieben werden und anschließend untersucht werden, ob dort bei Bornavirus-infizierten Vögeln ein Virusnachweis erfolgen kann.

Dazu wurden bei 130 Vögeln der zoologischen Ordnung Psittaciformes die Schleimhäute der Nasenhöhle und die damit assoziierten Nasendrüsen, Tränendrüsen und Harderschen Drüsen histologisch untersucht. Die Vögel gehörten 27 Arten, Unterarten oder Hybriden an und stammten aus dem Patientengut einer Vogelklinik. Sie waren eines natürlichen Todes verstorben oder aus Gründen, die mit der Studie nicht in Verbindung standen, euthanasiert worden. Bei 14 Tieren, die sechs Arten und einem Art-Hybridtyp angehörten, war eine Bornavirus-Infektion mit molekularbiologischen oder serologischen Methoden nachgewiesen worden, bei neun Vögeln PaBV-4 und bei fünf Vögeln PaBV-2. Da es sich um natürlich infizierte Papageienvögel handelte, war der Infektionszeitpunkt und somit die Dauer der Infektion nicht bekannt.

In der histologischen Untersuchung wurde festgestellt, dass sich die Struktur des respiratorischen und olfaktorischen Epithels in seinen Bestandteilen und im strukturellen Aufbau bei den untersuchten Arten nicht wesentlich unterschied. Die *Concha nasalis media* rollte sich bei den untersuchten Papageienvögeln nach ventral und nach dorsal ein. Vor allem im Randbereich des konvexen Teils ihrer Windung befanden sich zahlreiche Blutgefäße. Das respiratorische Epithel stellte sich als mehrreihiges, hochprismatisches Flimmerepithel dar, auf einer Basalmembran saßen Epithelzellen mit Kinozilienbesatz. Im respiratorischen Epithel waren muköse Drüsen zu finden. Das olfaktorische Epithel bestand aus

Basalzellen, Stützzellen und Sinneszellen (Riechzellen), diese trugen am apikalen Teil Zilien. In der *Lamina propria* stellten sich *Glandulae olfactoriae* dar.

Bei den in dieser Studie histologisch dargestellten Nasendrüsen handelte es sich um tubulo-azinäre Drüsen, ihre Ausführungsgänge waren mit einer einlagigen Schicht großkerniger Zylinderzellen mit basal liegenden Kernen ausgekleidet. Alle Nasendrüsen waren in der orbitalen Lage platziert, entsprachen also dem Typ II nach Technau (1936). Die Tränendrüse stellte sich als seröse Drüse dar, deutliche Unterschiede zwischen den untersuchten Papageienvögeln wurden nicht festgestellt. Die muköse Hardersche Drüse war bei den untersuchten Papageienvögeln vom Typ I nach Burns (1974, 1975, 1992) und von einer bindegewebigen Kapsel umgeben, die als Septen in den Drüsenkörper zog.

Nur bei einem Teil der Vögel, bei denen eine Infektion mit Bornaviren festgestellt worden war, wurde mittels Immunhistochemie Bornavirus-Antigen in den untersuchten Geweben dargestellt. Bornavirus-Antigen-Reaktivität wurde im respiratorischen Epithel des Kopfes in den Epithelzellen einschließlich der Kinozilien, in seinen mukösen Drüsenzellen, den Basalzellen sowie in Endothelzellen der Blutgefäße und Fibrozyten, und dabei im Zellkern oder im Zytoplasma der Zellen nachgewiesen. Die Reaktivität im Bereich der Kinozilien ist vermutlich als unspezifisch zu bewerten, da sie auch bei nicht mit Bornaviren infizierten Vögeln auftrat. Auch in den Schleimhaut-assoziierten Drüsen wurde Bornavirus-Antigen nachgewiesen. In der Nasendrüse erfolgte der Nachweis in den Epithelzellen der serösen Endstücke und in den Epithelzellen der Sammelgänge, hier waren sowohl das Zellplasma und auch die Zellkerne betroffen. In der Tränendrüse konnte PaBV-N-Antigen im Zellplasma und den Zellkernen der Epithelzellen nachgewiesen werden. In der Harderschen Drüse erfolgte ein Nachweis zusätzlich in den bindegewebigen Septen. Auf eine Bornavirus-Infektion zurückzuführende histologische Veränderungen waren nicht erkennbar.

Ob das respiratorische Epithel für Papageien-Bornaviren eine Viruseintrittsstelle darstellt, wie es für Bornaviren bei Säugetieren beschrieben wurde, müssen experimentelle Infektionsversuche zeigen.

VII. Summary

The respiratory mucosa and associated glands within the head area of Psittaciformes - histological investigations in birds with and without bornavirus infection

Stefanie Janke

In birds of the zoological order Psittaciformes, the physiological histology of the respiratory and olfactory mucosa and of the associated glands of the head area including the nasal gland, the lacrimal gland and the Harderian gland (*Glandula membranae nictitantis*) is largely unknown. Scientifically based knowledge whether parrot bornaviruses, the etiological agents of proventricular dilatation disease (PDD), do infect these tissues as it is known for Borna Disease virus in mammals is lacking. The objective of the present study was aiming to describing the physiological histology in a broad range of parrots, cockatoos and parakeets and the evaluation of conditions in naturally PaBV infected tissues.

The histology of the mucosa of the nasal cavity, the nasal glands, the lacrimal glands and the Harderian glands were investigated in 130 psittaciform individuals representing 27 species, subspecies or hybrids. All birds had been patients of a bird clinic and died off naturally or had been humanely euthanized due to animal welfare reasons. In 14 individuals, representing six species and one species-hybrid, infections with bornavirus could be detected by RT-PCR or serological methods. The viruses involved were identified as PaBV-4 in nine birds and as PaBV-2 in five individuals. All birds were naturally infected, the duration of infection remained unknown.

The histological investigations revealed a conserved structure and cellular composition of the respiratory and olfactory epithelia of the upper respiratory tract among the bird species included. The *Concha nasalis media* was found to scroll ventrally and dorsally in all psittaciforms investigated. Blood vessels were frequently detected in the peripheral areas of the convex part of the scrolled turbinates. The respiratory epithelium was found to be a pseudostratified columnar ciliated epithelium. Epithelial cells with kinocilia were sitting on basal membranes. The respiratory epithelium contained numerous mucous glands. The

olfactory epithelium consisted of basal cells, supporting cells and sensory cells (olfactory cells), the latter showing cilia in their apical parts. *Glandulae olfactoriae* were situated in the *Lamina propria*.

The nasal glands presented as tubulo-acinar glands, their ducts were lined by a single layer of columnar epithelial cells with basally situated nuclei. The nasal glands of all birds included in this investigation lied in an orbital position, they thus corresponded to the type II according to Technau (1936). The lacrimal glands showed typical features of serous glands, distinct differences among the psittaciform species of this study were not found. The mucous Harderian gland of the birds investigated corresponded to the type I according to Burns (1974, 1975, 1992). Their gland body was surrounded by a connective tissue capsule with septa reaching into the gland.

Bornavirus antigen was detected in the covered tissues only in part of the bornavirus-infected birds by immunohistochemistry. Antigen reactivity was found in the respiratory epithelia of the head including the epithelial cells with the kinocilia, the mucous glands, the basal cells, the endothelial cells of blood vessels and the fibrocytes, being detected in the nucleus and the cytoplasm of the cells. The reactivity of the kinocilia, however, might be caused by unspecific binding because as could be demonstrated in non-infected birds. Bornavirus antigen was also present in the mucosa-associated glands. It was detected in the epithelial cells of the serous ends and the collection ducts of the nasal gland, with coloration of both cell nuclei and cytoplasm. In the lacrimal gland, PaBV antigen was detected in the cytoplasm and the nucleus of the epithelial cells, while the Harderian gland tissue demonstrated antigen in the connective tissue septa as well. We were not able to demonstrate histopathological changes which might be caused by bornavirus infection.

Future experimental infection trials are necessary to reveal, whether the respiratory epithelium is an entry portal for parrot bornavirus as described for Borna Disease virus in mammals.

VIII. Literaturverzeichnis

- Aitken, I. D. & Survashe, B. D. (1976). A procedure for location and removal of the lachrymal and harderian glands of avian species. 119 *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 53, 193-195.
- Aitken, I. D. & Survashe, B. D. (1977). Lymphoid cells in avian paraocular glands and paranasal tissues. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 58, 235-244.
- Albini, B., Wick, G., Rose, E. & Orlans, E. (1974). Immunoglobulin production in chicken Harderian glands. *International Archives of Allergy and Immunology*, 47, 23-34.
- Algermissen, D. (2010). *Nachweis von Borna Disease Virus-spezifischen Proteinen und deren subgenomischer RNA bei natürlich infizierten Pferden*. (Dissertation), Hannover.
- Altunay, H. & Kozlu, T. (2004). The fine structure of the Harderian gland in the ostrich (*Struthio camelus*). *Anatomia Histologia Embryologia*, 33, 141-145.
- Amarasinghe, G. K., Aréchiga Ceballos, N. G., Banyard, A. C., Basler, C. F., Bavari, S., Bennett, A. J., Blasdel, K. R., Briese, T., Bukreyev, A., Cai, Y., Calisher, C. H., Campos Lawson, C., Chandran, K., Chapman, C. A., Chiu, C. Y., Choi, K.-S., Collins, P. L., Dietzgen, R. G., Dolja, V. V., Dolnik, O., Domier, L. L., Dürwald, R., Dye, J. M., Easton, A. J., Ebihara, H., Echevarría, J. E., Fooks, A. R., Formenty, P. B. H., Fouchier, R. A. M., Freuling, C. M., Ghedin, E., Goldberg, T. L., Hewson, R., Horie, M., Hyndman, T. H., Jiāng, D., Kityo, R., Kobinger, G. P., Kondō, H., Koonin, E. V., Krupovic, M., Kurath, G., Lamb, R. A., Lee, B., Leroy, E. M., Maes, P., Maisner, A., Marston, D. A., Mor, S. K., Müller, T., Mühlberger, E., Ramírez, V. M. N., Netesov, S. V., Ng, T. F. F., Nowotny, N., Palacios, G., Patterson, J. L., Pawęska, J. T., Payne, S. L., Prieto, K., Rima, B. K., Rota, P., Rubbenstroth, D., Schwemmler, M., Siddell, S., Smither, S. J., Song, Q., Song, T., Stenglein, M. D., Stone, D. M., Takada, A., Tesh, R. B., Matsumiya Thomazelli, L., Tomonaga, K., Tordo, N., Towner, J. S., Vasilakis, N., Vazquez-Moron, S., Verdugo, C., Volchkov, V. E., Wahl, V., Walker, P. J., Wang, D., Wang, L.-F., Wellehan, J. F. X., Wiley, M. R., Whitfield, A. E., Wolf, Y. I., Yè, G., Zhāng, Y.-Z. & Kuhn, J. H. (2018). Taxonomy of the order *Mononegavirales*: update 2018. *Archives of Virology*, 163, 2283-2294.
- Ashash, E., Malkinson, M., Meir, R., Perl, S. & Weisman, Y. (1996). Causes of losses including a Borna disease paralytic syndrome affecting young ostriches of one breeding organization over a five-year period (1989-1993). *Avian Diseases*, 40, 240-245.
- Aughey, E. & Frye, F. L. (2001). *Comparative Veterinary Histology with Clinical*

Correlates. London: Manson Publishing Ltd.

- Baba, T., Kawata, T., Masumoto, K. & Kajiwara, T. (1990). Role of the Harderian gland in immunoglobulin A production in chicken lacrimal fluid. *Research in Veterinary Science*, 49, 20-24.
- Ball, R. L. (2003). *Charadriiformes* (Gulls, Shorebirds). In M. E. Fowler (Ed.), *Zoo and Wild Animal Medicine* 5th edn (pp 136-140). St. Louis, Missouri, Philadelphia, London, Toronto: W. B. Saunders Company.
- Bang, B. G. & Bang F.B. (1968). Localized lymphoid tissues and plasma cells in paraocular and paranasal organ systems in chickens. *American Journal of Pathology*, 53, 735–751.
- Bateman, G., Forbes, P., Mackeith, B. & Peberdy, R. (1988). *Die Tiere der Welt*, Band 6, Vögel 1. Gütersloh: Bertelsmann Lexikothek Verlag GmbH.
- Bond, M. W., Downs, D. & Wolf, S. (1993). Screening for psittacine proventricular dilatation syndrome. In *Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians* (pp. 92-97). Nashville, TN.
- Boydak, M. & Aydin, M. F. (2009). Histology of the Harderian gland of domestic geese (*Anser anser domesticus*). *Acta Veterinaria Brno*, 78, 199-204.
- Bradley, O. C. (1960). The eye and its appendage. In O.C. Bradley & T. Grahame (Eds), *The Structure of the Fowl* 4th edn (pp. 101-104). London: Oliver and Boyd Ltd.
- Brüggemann, J. (2012). *Evaluiierung der Wachtel als Tiermodell für Infektionen mit aviären Bornaviren und die Neuropathische Drüsenmagendilatation*. (Dissertation), München.
- Burmeister, A.-K. (2016). *Die Beziehung von Menschen zu ihren Vögeln in der Heimtierhaltung - Eine empirisch-tierärztliche Studie unter Entwicklung einer psychometrischen Skala der Mensch-Vogel-Beziehung*. (Dissertation), München.
- Burns, R. B. (1974). *The Harderian gland in birds*. (M. Phil. Thesis), London.
- Burns, R. B. (1975). Plasma cells in the avian Harderian gland and the morphology of the gland in the rook. *Canadian Journal of Zoology*, 53, 1258-1269.
- Burns, R. B. (1976). Specific antibody production against a soluble antigen in the Harderian gland of the domestic fowl. *Clinical and experimental immunology*, 26, 371–374.
- Burns, R. B. (1977). Possible route of antigen uptake by the Harderian gland of the domestic fowl. *British poultry science*, 18, 407- 409.

- Burns, R. B. (1992). The Harderian Gland in Birds: Histology and Immunology. In S. M. Webb, R. A. Hoffmann, M. L. Puig-Domingo & R. J. Reiter (Eds.) *Harderian Glands- Porphyrin Metabolism, Behavioral and Endocrine Effects* (pp. 155-163). Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Carbone, K. M., Duchala, C. S., Griffin, J. W., Kincaid, A. L. & Narayan, O. (1987). Pathogenesis of Borna disease in rats: evidence that intra-axonal spread is the major route for virus dissemination and the determinant for disease incubation. *Journal of virology*, 61, 3431-3440.
- Clark, F. D. (1984). Proventricular dilatation syndrome in large psittacine birds. *Avian Diseases*, 28, 813-815.
- Cords, E. (1904). Beiträge zur Lehre vom Kopfnervensystem der Vögel. *Anatomische Hefte*, 26, 49-100.
- Cors, J.-C. (2013). *Untersuchungen zu lokalen Immunreaktionen nach Impfung gegen das Newcastle Disease Virus mit einem rekombinanten Putenherpesvirus und einer herkömmlichen Lebendvakzine*. (Dissertation), Hannover.
- Dauborn, S. (2014). *Lehrbuch für Tierheilpraktiker*, 4. Auflage. Stuttgart: Sonntag Verlag in MVS Medizinverlage.
- Davelaar, F. G., Noordzij, A. & Vanderdonk, J. A. (1982). A study on the synthesis and secretion of immunoglobulins by the Harderian gland of the fowl after eyedrop vaccination against infectious bronchitis at 1-day old. *Avian Pathology*, 11, 63-79.
- De Kloet, A. H., Kerski, A. & De Kloet, S. R. (2011). Diagnosis of Avian bornavirus infection in psittaciformes by serum antibody detection and reverse transcription polymerase chain reaction assay using fester calami. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 23, 421-429.
- De Kloet, S. R. & Dorrestein, G. M. (2009). Presence of avian bornavirus RNA and anti-avian bornavirus antibodies in apparently healthy macaws. *Avian diseases*, 53, 568-573.
- Degiorgis, M. P., Berg, A. L., Hard Af Segerstad, C., Morner, T., Johansson, M. & Berg, M. (2000). Borna disease in a free-ranging lynx (*Lynx lynx*). *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 3087-3091.
- Del Cacho, E., Gallego, M., Felices, C. & Bascuas, J. A. (1991). Myofibroblasts and myoepithelial cells in the chicken Harderian gland. *Histology and Histopathology*, 6, 303-308.
- Del Cacho, E., Gallego, M., Marcotegui, M. A. & Bascuas, J. A. (1993). Follicular dendritic cell activation in the Harderian gland of the chicken. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 35, 339-351.

-
-
- Dimitrov, D. S. & Nikiforov, I. P. (2005). Histological and histochemical studies of Harderian gland, lacrimal gland and bursa of fabricius in mallard ducks (*Anas sterilis*) with chlamydial infection. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 8, 119-127.
- Dohms, J. E., Lee, K. P. & Rosenberger, J. K. (1981). Plasma cell changes in the gland of Harder following infectious bursal disease virus infection of the chicken. *Avian diseases*, 25, 683-695.
- Doneley, R. J., Miller, R. I. & Fanning, T. E. (2007). Proventricular dilatation disease: an emerging exotic disease of parrots in Australia. *Australian Veterinary Journal*, 85, 119-123.
- Eulenberger, K. (1995). Taucher, Pinguine, Röhrennasen, Ruderfüßer, Wat- und Möwenvögel. In R. Göldenboth & H.-G. Klös (Eds.), *Krankheiten der Zoo- und Wildtiere* (pp. 488-502). Berlin: Blackwell Wissenschafts-Verlag.
- Fourman, J. & Ballantyne, B. (1967). Cholinesterase activity in the harderian gland of *anas domesticus*. *The Anatomical record*, 159, 17-27.
- Frewein, J. & Sinowatz, F. (2004). Sinnesorgane. In R. Nickel, A. Schummer & E. Seiferle (Eds.), *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere*, Band V, 4th edn (pp. 365-386). Stuttgart: Parey Verlag.
- Frewein, J. (2004). Nervensystem. In R. Nickel, A. Schummer & E. Seiferle, (Eds.), *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere*, Band V, 4th edn (pp. 331-364). Stuttgart: Parey Verlag.
- Fujino, K., Horie, M., Honda, T., Nakamura, S., Matsumoto, Y., Francischetti, I. M. & Tomonaga, K. (2012). Evolutionarily conserved interaction between the phosphoproteins and X proteins of bornaviruses from different vertebrate species. *PLoS ONE*, 7, e51161.
- Gancz, A. Y., Kistler, A. L., Greninger, A. L., Farnoushi, Y., Mechani, S., Perl, S., Berkowitz, A., Perez, N., Clubb, S., DeRisi, J. L., Ganem, D. & Lublin, A. (2009a). Experimental induction of proventricular dilatation disease in cockatiels (*Nymphicus hollandicus*) inoculated with brain homogenates containing avian bornavirus 4. *Virology Journal*, 6, 100.
- Gancz, A. Y., Kistler, A. L., Greninger, A. L., Farnoushi, Y., Mechani, Clubb, S., DeRisi, J. L., Skewes-Cox, P., Fischer, K., Sorber, K., Chiu, C. Y., Lublin, A., Wen, C. C., Karlene, S. B. & Ganem, D. (2009b). *Divergent Borna viruses are associated with proventricular dilatation disease* (pp. 147-154). European Association of Avian Veterinarians, Antwerpen.
- Gancz, A. Y., Clubb, S. & Shivaprasad, H.L. (2010). Advanced diagnostic approaches and current management of proventricular dilatation disease. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 13, 471-494.

-
-
- Gancz, A. Y., Elbaz, D., Farnoushi, Y. & Lublin, A. (2012). Clinical recovery from proventricular dilatation disease following treatment with Cyclosporine-A in an African grey parrot (*Psittacus erithacus*). In *Proceedings of the 17. DVG-Tagung über Vogelkrankheiten* (pp. 130-133), München.
- Gerlach, H. (1986). Update of the macaw wasting syndrome. In *Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians* (pp. 21-25). Miami, FL.
- Glick, B. (1978). The immune response in the chicken: Lymphoid development of the bursa of Fabricius and thymus and an immune response role for the gland of Harder. *Poultry science*, 57, 1441-1444.
- Graham, D. L. (1991). "Wasting/Proventricular dilatation disease" A pathologist's view. In *Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians* (pp. 43-44). Chicago, IL.
- Gray, P., Hoppes, S., Suchodolski, P., Mirhosseini, N., Payne, S., Villanueva, I., Shivaprasad, H. L., Honkavuori, K. S., Brieese, T., Reddy, S. M. & Tizard, I. (2010). Use of avian bornavirus isolates to induce proventricular dilatation disease in conures. *Emerging infectious diseases*, 16, 473-479.
- Gregory, C., Latimer, K. S., Niagro, F., Ritchie, B. W., Campagnoli, R. P., Norton, T. M. & Greenacre, C. B. (1994). A review of proventricular dilatation syndrome. *Journal of the Association of Avian Veterinarians*, 8, 69-75.
- Gregory, C. R., Ritchie, B. W., Latimer, K. S., Steffens, W. L., Campagnoli, R. P., Pesti, D. A. & Lukert, P. D. (1997). Proventricular dilatation disease: A viral epornitic. In *Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians* (pp. 43-52). Reno, NV.
- Gregory, C. R., Ritchie, B. W., Latimer, K. S., Steffens, W. L., Pesti, D. A., Campagnoli, R. P. & Lukert, P. D. (2000). Progress in understanding proventricular dilatation disease. In *Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians* (pp. 269-275). Weatherford, TX.
- Hallensleben, W., Schwemmle, M., Hausmann, J., Stitz, L., Volk, B., Pagenstecher, A. & Staeheli, P. (1998). Borna disease virus-induced neurological disorder in mice: infection of neonatales results in immunopathology. *Journal of Virology*, 72, 4379-4386.
- Heatley, J.J. & Villalobos, A.R. (2012). Avian bornavirus in the urine of infected birds. *Veterinary Medicine: Research and Reports (Auckl)*, 3, 19-23.
- Heckmann, J., Enderlein, D., Piepenbring, A. K., Herzog, S., Heffels-Redmann, U., Malberg, S., Herden, C. & Lierz, M. (2017). Investigation of Different Infection Routes of Parrot Bornavirus in Cockatiels. *Avian Diseases*, 61, 90-95.

-
-
- Hees, H. (2006). Atmungsapparat. In F. Sinowatz & H. Hees (Eds.), *Histologie - Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie* 4th edn (pp. 252-261). München: Eigenverlag Fred Sinowatz.
- Heinroth, O. u. M. (1927). *Die Vögel Mitteleuropas, Band III*. Frankfurt/ Main, Zürich: Verlag Harri Deutsch.
- Herzog, S., Enderlein, D., Heffels-Redmann, U., Piepenbring, A., Neumann, D., Kaleta, E. F., Müller, H., Lierz, M. & Herden, C. (2010). Indirect immunofluorescence assay for intra vitam diagnosis of avian bornavirus infection in psittacine birds. *Journal of Clinical Microbiology*, 48, 2282-2284.
- Hilbe, M., Herrsche, R., Kolodziejek, J., Nowotny, N., Zlinszky, K. & Ehrensperger, F. (2006). Shrews as Reservoir Hosts of Borna Disease Virus. *Emerging Infectious Diseases*, 12, 675-677.
- Högemann, C. (2018). *Hämatologische, blutchemische und proteinelektrophoretische Veränderungen bei Kongo-Graupapageien (Psittacus erithacus) nach experimenteller Infektion mit Parrot Bornavirus 4*. (Dissertation), München.
- Hoffmann, A. (2010). Atmungsapparat. In J. Seeger, A. Hoffmann, J. Kacza & T. Stahl (Eds.) *Histologische Übungen für die Tiermedizin*, 2nd edn (pp. 80-91). Hannover: Schlütersche Verlagsgesellschaft.
- Hoffmann, B., Tappe, D., Hoper, D., Herden, C., Boldt, A., Mawrin, C., Niederstrasser, O., Müller, T., Jenckel, M., van der Grinten, E., Lutter, C., Abendroth, B., Teifke, J. P., Cadar, D., Schmidt-Chanasit, J., Ulrich, R. G. & Beer, M. (2015). A Variegated squirrel bornavirus associated with fatal human encephalitis. *New England Journal of Medicine*, 373, 154-162.
- Honkavuori, K. S., Shivaprasad, H. L., Williams, B. L., Quan, P. L., Hornig, M., Street, C., Palacios, G., Hutchison, S. K., Franca, M., Egholm, M., Brieese, T. & Lipkin, W. I. (2008). Novel Borna virus in psittacine birds with proventricular dilatation disease. *Emerging Infectious Diseases*, 14, 1883-1886.
- Hoppes, S., Gray, P. L., Payne, S., Shivaprasad, H. L. & Tizard, I. (2010). The isolation, pathogenesis, diagnosis, transmission, and control of avian bornavirus and proventricular dilatation disease. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 13, 495-508.
- Horie, M., Ueda, K., Ueda, A., Honda, T. & Tomonaga, K. (2012). Detection of Avian bornavirus 5 RNA in *Eclectus roratus* with feather picking disorder. *Microbiology and Immunology*, 56, 346-349.
- Hornig, M., Brieese, T., Licinio, J., Khabbaz, R.F., Altshuler, L.L., Potkin, S.G., Schwemmle, M., Siemetzki, U., Mintz, J., Honkavuori, K., Kraemer, H.C., Egan, M.F., Whybrow, P.C., Bunney, W.E. & Lipkin, W.I. (2012).

-
-
- Absence of evidence for bornavirus infection in schizophrenia, bipolar disorder and major depressive disorder. *Molecular Psychiatry*, 17, 486-93.
- Jacobsen, B., Algermissen, D., Schaudien, D., Venner, M., Herzog, S., Wentz, E., Hewicker-Trautwein, M., Baumgartner, W. & Herden, C. (2010). Borna disease in an adult alpaca stallion (*Lama pacos*). *Journal of Comparative Pathology*, 143, 203-208.
- Jacobson, L. L. (1813). Sur une glande conglomerée appartenante à la cavité nasale, zitiert aus Technau, G. (1936). Die Nasendrüse der Vögel. *Journal für Ornithologie*, 84, 511-617.
- Kern, T. J., Paul-Murphy, J. & Murphy, C.J. (1996). Disorders of the Third Eyelid in Birds: 17 Cases. *Association of Avian Veterinarians*, 10, 12-18.
- Kern, T. J. (2007). Exotic Animal Ophthalmology. In K. N. Gelatt (Ed.), *Veterinary Ophthalmology*, Volume 2, 2nd edn (pp. 1370-1405). New York City: John Wiley & Sons.
- King, A. S. & McLelland, J. (1975). *Outlines of Avian Anatomy*. London: Baillière Tindall.
- Kistler, A. L., Gancz, A., Clubb, S., Skewes-Cox, P., Fischer, K., Sorber, K., Chiu, C. Y., Lublin, A., Mechani, S., Farnoushi, Y., Greninger, A., Wen, C., Karlene, S., Ganem, D. & DeRisi, J. (2008). Recovery of divergent avian bornaviruses from cases of proventricular dilatation disease: Identification of a candidate etiologic agent. *Virology Journal*, 5, 88.
- Kistler, A. L., Smith, J. M., Greninger, A. L., DeRisi, J. L. & Ganem, D. (2010). Analysis of naturally occurring avian bornavirus infection and transmission during an outbreak of proventricular dilatation disease among captive psittacine birds. *Journal of Virology*, 84, 2176-2179.
- Kleckowska-Nawrot, J., Goździewska-Harłajczuk, K., Kowalczyk, A., Łukaszewicz, E. & Nowaczyk, R. (2015). Histological, histochemical and ultrastructural studies on Harderian and lacrimal glands of the Capercaillie (*Tetrao urogallus major* L.). *Acta Biologica Hungarica*, 67, 27-41.
- König, H. E., Navarro, M., Zengerling, G. & Korbel, R. (2016). Respiratory system (apparatus respiratorius). In H. E. König, R. Korbel, H.-G. Liebich (Eds.), *Avian Anatomy Textbook and Colour Atlas*, 2nd Edition (pp. 118-130). Sheffield: 5M Publishing Ltd.
- König, H. E., Maierl, J., Weissengruber, G. & Forstenpointner, G. (2009). Einführung – Allgemeines zur Fortbewegung und Anatomie der Vögel. In H. E. König, R. Korbel, H.-G. Liebich (Eds.), *Anatomie der Vögel - Klinische Aspekte und Propädeutik Zier-, Greif-, Zoo-, Wildvögel und Wirtschaftsgeflügel*, 2nd Edition (pp. 5-20). Stuttgart: Schattauer GmbH.
- Korbel, R., Kösters, J. & Benedikt, B. (1998). Schmerz und Analgesie beim Vogel

- Eine Übersicht. In *Proceedings of the 11. DVG-Tagung über Vogelkrankheiten* (pp. 203-208), München.
- Korbel, R. (2000). Avian Ophthalmology: A Clinically Orientated Approach. In *Proceedings of the Association of Avian Veterinarians* (pp. 439-455). Portland, OR.
- Korbel, R. (2004). Konjunktivitis bei einem Nymphensittich (*Nymphicus hollandicus* L. 1758) infolge Chlamydophilose (Psittakose). *Tierärztliche Praxis*, 32, 258-261.
- Korbel, R., Reese, S. & Liebich, H.-G. (2009). Fixationstechniken und Anästhesieverfahren. In H. E. König, R. Korbel, H.-G. Liebich (Eds.), *Anatomie der Vögel -Klinische Aspekte und Propädeutik Zier-, Greif-, Zoo-, Wildvögel und Wirtschaftsgeflügel*, 2nd Edition (pp. 293-304). Stuttgart: Schattauer GmbH.
- Korbel, R., Kronthaler, F., Hufen, H. & Rinder, M. (2011). Experimental infection of African grey parrots with avian bornavirus. In *Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians* (p. 295).
- Kowalski, W. J., Malkinson, M., Leslie, G. A. & Small, P. A. (1978). The secretory immunological system of the fowl. VI. The effect of chemical bursectomy on immunoglobulin concentration in tears. *Immunology*, 34, 663-667.
- Krautz, K. (2015). *Neuropathologische Langzeitveränderungen im Gehirn von Lewis-Ratten nach neonataler Aerosol-Infektion mit dem Borna-Disease-Virus*. (Dissertation), Giessen.
- Kühnel, W. & Beier, H. M. (1973). Morphologie und Cytochemie der Harderschen Drüse von Anatiden. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, 141, 255-283.
- Lang, G. (2006). *Histotechnik: Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik*. Wien, New York: Springer Verlag.
- Last, R. D., Weissenböck, H., Nedorost, N. & Shivaprasad, H. L. (2012). Avian bornavirus genotype 4 recovered from naturally infected psittacine birds with proventricular dilatation disease in South Africa. *Journal of the South African Veterinary Association*, 83, 938.
- Leal de Araujo, J., Rech, R. R., Heatley, J. J., Guo, J., Giaretta, P. R., Tizard, I. & Rodrigues-Hoffmann, A. (2017). From nerves to brain to gastrointestinal tract: A time-based study of parrot bornavirus 2 (PaBV-2) pathogenesis in cockatiels (*Nymphicus hollandicus*). *PLoS ONE*, 12, e0187797.
- Liebich, H.-G. (2010). Sinnesorgane (*Organa sensuum*). In H.-G. Liebich (Ed.), *Funktionelle Histologie der Haussäugetiere und Vögel -Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis* 5th edn (pp. 369-396). Stuttgart:

Schattauer GmbH.

- Liebich, H.-G. & Zengerling, G. (2010). Atmungsapparat (*Apparatus respiratorius*). In H.-G. Liebich (Ed.), *Funktionelle Histologie der Haussäugetiere und Vögel -Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis* 5th edn (pp. 255-274). Stuttgart: Schattauer GmbH.
- Lierz, M., Hafez, H. M., Honkavuori, K. S., Gruber, A. D., Olias, P., Abdelwhab, E. M., Kohls, A., Lipkin, W. I., Briese, T. & Hauck, R. (2009). Anatomical distribution of avian bornavirus in parrots, its occurrence in clinically healthy birds and ABV-antibody detection. *Avian Pathology*, 38, 491-496.
- Löffler, B. A. (2011). *Aviäre Bornaviren bei Papageien: Untersuchungen zur Antigen-Verteilung im Gewebe*. (Dissertation), München.
- Lublin, A., Mechani, S., Farnoushi, I., Perl, S. & Bendheim, U. (2006). An outbreak of proventricular dilatation disease in psittacine breeding farm in Israel. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 61, 16-19.
- Lutz, H., Addie, D. D., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., Gruffydd-Jones, T., Hartmann, K., Horzinek, M. C., Hosie, M. J., Lloret, A., Marsilio, F., Pennisi, M. G., Radford, A. D., Thiry, E., Truyen, U. & Mostl, K. (2015). Borna disease virus infection in cats: ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 17, 614-616.
- Lutz, M. & Wilson, R. (1991). Psittacine proventricular dilatation syndrome in an Umbrella cockatoo. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 198, 1962-1964.
- Mannl, A., Gerlach, H. & Leipold, R. (1987). Neuropathic gastric dilatation in psittaciformes. *Avian diseases*, 31, 214-221.
- Mansikka, A., Sandberg, M., Veromaa, T., Vainio, O., Granfors, K. & Toivanen, P. (1989). B cell maturation in the chicken Harderian gland. *The Journal of Immunology*, 142, 1826-1833.
- Maxwell, M. H., Rothwell, B. & Burns, R. B. (1986). A fine structural study of the turkey harderian gland. *Journal of Anatomy*, 148, 147-157.
- Mirhosseini, N., Gray, P. L., Hoppes, S., Tizard, I., Shivaprasad, H. & Payne, S. (2011). Proventricular dilatation disease in cockatiels (*Nymphicus hollandicus*) after infection with a genotype 2 avian bornavirus. *Journal of Avian Medicine and Surgery*, 25, 199-204.
- Mobini, B. (2012). Histological and histochemical studies on the Harderian gland in native chickens. *Veterinarni Medicina*, 57, 404-409.
- Morales, J. A., Herzog, S., Kompter, C., Frese, K. & Rott, R. (1988).

- Axonaltransport of Borna disease virus along olfactory pathways in spontaneously and experimentally infected rats *Medical Microbiology and Immunology*, 177, 51-68.
- Mueller, A. P., Sato, K. & Glick, B. (1971). The chicken lacrimal gland, gland of Harder, caecal tonsil, and accessory spleens as sources of antibody-producing cells. *Cellular immunology*, 2, 140-152.
- Müller, W., Gieldanowski, J., Firsching, R. & Błaszczyk, B. (1991). Russel bodies-containing cells in the Harderian gland of the chicken in relation to different immune conditions. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 39, 1-5.
- Myers, R. K. & McGavin, M. D. (2009). Schädigung von Zellen und Geweben – Irreversible Zellschädigung und Zelltod. In M. D. McGavin, J. F. Zachary (Eds.), *Pathologie der Haustiere –Allgemeine, spezielle und funktionelle Veterinärpathologie*, 1st Edition (pp. 1-60). München: Elsevier GmbH.
- Nakamura, Y., Nakaya, T., Hagiwara, K., Momiyama, N., Kagawa, Y., Taniyama, H., Ishihara, C., Sata, T., Kurata, T. & Ikuta, K. (1999). High susceptibility of Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) to Borna disease virus. *Vaccine*, 17, 480-489.
- Neumann, U. & Kaleta, E. F. (1977). Untersuchungen zur immunologischen Funktion der Harderschen Drüse des Huhnes. *Zoonoses and public health*, 24, 331-339.
- Nickel, R., Schummer, A. & Seiferle, E. (1973). Zentrales Nervensystem. In R. Nickel, A. Schummer & E. Seiferle (Eds) *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band V, Anatomie der Vögel* 2nd edn (pp. 118-143). Berlin und Hamburg: Paul Parey.
- Nitzsch, C. L. (1820). Über die Nasendrüse der Vögel. *Meckel's Archiv für Physiologie VI*. Zitiert aus Technau, G. (1936). Die Nasendrüse der Vögel - Zugleich ein Beitrag zur Morphologie der Nasenhöhle. *Journal für Ornithologie*, 84, 511-617.
- Nobach, D., Bourg, M., Herzog, S., Lange-Herbst, H., Encarnação, J. A., Eickmann, M. & Herden, C. (2015). Shedding of Infectious Borna Disease Virus-1 in Living Bicolored White-Toothed Shrews. *PLoS ONE*, 10, e0137018.
- Ogawa, H., Sanada, Y., Sanada, N., Kudo, M., Tuchiya, K., Kodama, T. & Uetsuka, K. (2011). Proventricular dilatation disease associated with avian bornavirus infection in a Citron-crested Cockatoo that was born and hand-reared in Japan. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 73, 837-840.
- Ohshima, K. & Hiramatsu, K. (2002). Immunohistochemical localization of three different immunoglobulin classes in the Harderian gland of young chickens. *Tissue and Cell*, 34, 129-133.

-
-
- Olah, I., Scott, T. R., Gallego, M., Kendall, C. & Glick, B. (1992). Plasma Cells Expressing Immunoglobulins M and A but not Immunoglobulin G Develop an Intimate Relationship with Central Canal Epithelium in the Harderian Gland of the Chicken *Poultry science*, 71, 664-676.
- Ouyang, N., Storts, R., Tian, Y., Wigle, W., Villanueva, I., Mirhosseini, N., Payne, S., Gray, P. & Tizard, I. (2009). Histopathology and the detection of avian bornavirus in the nervous system of birds diagnosed with proventricular dilatation disease. *Avian Pathology*, 38, 393-401.
- Paule, W. J. & Hayes, E. R. (1958). Comparative histochemical studies of the Harderian gland. *Anatomical Record*, 130, 436.
- Payne, S., Covalada, L., Jianhua, G., Swafford, S., Baroch, J., Ferro, P. J., Lupiani, B., Heatley, J. & Tizard, I. (2011a). Detection and characterization of a distinct bornavirus lineage from healthy Canada geese (*Branta canadensis*). *Journal of Virology*, 85, 12053-12056.
- Payne, S., Shivaprasad, H. L., Morhosseini, N., Gray, P., Hoppes, S., Weissenböck, H. & Tizard, I. (2011b). Unusual and severe lesions of proventricular dilatation disease in cockatiels (*Nymphicus hollandicus*) acting as healthy carriers of avian bornavirus (ABV) and subsequently infected with a virulent strain of ABV *Avian Pathology*, 40, 15-22.
- Phalen, D. N. (1986). An outbreak of psittacine proventricular dilatation syndrome (PPDS) in a private collection of birds and an atypical form of PPDS in a nanday conure. In *Proceedings of the Annual Conference Association of Avian Veterinarians* (pp. 27-34). Miami, FL.
- Philadelpho, N. A., Rubbenstroth, D., Guimaraes, M. B. & Piantino Ferreira, A. J. (2014). Survey of bornaviruses in pet psittacines in Brazil reveals a novel parrot bornavirus. *Veterinary microbiology*, 174, 584-590.
- Piepenbring, A. K., Enderlein, D., Herzog, S., Kaleta, E.F., Heffels-Redmann, U., Ressmeyer, S., Herden, C. & Lierz, M. (2012). Pathogenesis of avian bornavirus in experimentally infected cockatiels. *Emerging Infectious Diseases*, 18, 234-241.
- Piepenbring, A. K., Enderlein, D., Herzog, S., Al-Ibadi, B., Heffels-Redmann, U., Heckmann, J., Lange-Herbst, H., Herden, C. & Lierz, M. (2016). Parrot Bornavirus (PaBV)-2 isolate causes different disease patterns in cockatiels than PaBV-4. *Avian Pathology*, 45, 156-168.
- Raghav, R., Taylor, M., DeLay, J., Ojkic, D., Pearl, D. L., Kistler, A. L., DeRisi, J. L., Ganem, D. & Smith, D. A. (2010). Avian bornavirus is present in many tissues of psittacine birds with histopathologic evidence of proventricular dilatation disease. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 22, 495-508.
- Reavill, D. & Schmidt, R. (2007). Lesions of the proventriculus/ ventriculus of pet

- birds. 1640 cases. In *Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians* (pp. 89-93). Providence, RI.
- Reese, S., Korbel, R. & Liebich, H.-G. (2009). Sehorgan (*Organum visus*). In H.-G. Liebich (Ed.), *Anatomie und Propädeutik des Geflügels* 2nd edn (pp. 229-256). Stuttgart: Schattauer Verlag.
- Reuter, A., Ackermann, A., Kothlow, S., Rinder, M., Kaspers, B. & Staeheli, P. (2010). Avian bornaviruses escape recognition by the innate immune system. *Viruses*, 2, 927-938.
- Richt, J. A., Herzog, S., Haberzettl, K. & Rott, R. (1993). Demonstration of Borna disease virus-specific RNA in secretions of naturally infected horses by the polymerase chain reaction. *Medical Microbiology and Immunology*, 182, 293-304.
- Richt, J. A., Pfeuffer, I., Christ, M., Frese, K., Bechter, K. & Herzog, S. (1997). Borna disease virus infection in animals and humans. *Emerging Infectious Diseases*, 3, 343-352.
- Ridgway, R. A. & Gallerstein, G. A. (1983). Proventricular dilatation in psittacines. In *Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians* (pp. 228-233). San Diego, CA.
- Rinder, M., Ackermann, A., Kempf, H., Kaspers, B., Korbel, R. & Staeheli, P. (2009a). Broad tissue and cell tropism of avian bornavirus in parrots with proventricular dilatation disease. *Journal of virology*, 83, 5401-5407.
- Rinder, M., Kaspers, B., Staeheli, P. & Korbel, R. (2009b). Die "neuropathische Magendilatation der Papageienvögel" und aviäre Borna-Viren - aktuelle Entwicklungen. *Veterinär Spiegel*, 19, 188-191.
- Rinder, M., Adrian, K., Staeheli, P., Kaspers, B. & Korbel, R. (2010a). Bornavirus infections: Development of serological tests for psittacine birds. In *Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians* (p. 17). San Diego, CA.
- Rinder, M., Kaspers, B., Staeheli, P. & Korbel, R. (2010b). Diagnostik von aviären Bornaviren. In *Proceedings of the 16. DVG-Tagung über Vogelkrankheiten* (pp. 34-36). München, Germany.
- Rinder, M., Kronthaler, F., Hufen, H., Kaspers, B., Stäheli, P. & Korbel, R. (2013). Experimental infection of African grey parrots (*Psittacus erithacus erithacus*) with avian bornavirus by subcutaneous application of purified virus. In *1st International Conference on Avian, Herpetological and Exotic Mammal Medicine* (pp.353-354). Wiesbaden, Germany.
- Rothwell, B., Wight, P. A., Burns, R. B. & Mackenzie, G. M. (1972). The Harderian glands of the domestic fowl. 3. Ultrastructure. *Jornal of Anatomy*, 112, 233-250.

-
-
- Rott, R., Herzog, S., Richt, J. & Stitz, L. (1988). Immune-mediated pathogenesis of borna disease. *Zentralblatt für Bakteriologie und Hygiene*, 270, 295-301.
- Rubbenstroth, D., Rinder, M., Kaspers, B. & Staeheli, P. (2012). Efficient isolation of avian bornaviruses (ABV) from naturally infected psittacine birds and identification of a new ABV genotype from a Salmon-crested cockatoo (*Cacatua moluccensis*). *Veterinary Microbiolog*, 161, 36-42.
- Rubbenstroth, D., Rinder, M., Stein, M., Höper, D., Kaspers, B., Brosinski, K., Horie, M., Schmidt, V., Legler, M., Korbel, R. & Staeheli, P. (2013). Avian bornaviruses are widely distributed in canary birds (*Serinus canaria f. domestica*). *Veterinary Microbiology*, 165, 287-295.
- Rubbenstroth, D., Brosinski, K., Rinder, M., Olbert, M., Kaspers, B., Korbel, R. & Staeheli, P. (2014a). No contact transmission of avian bornavirus in experimentally infected cockatiels (*Nymphicus hollandicus*) and domestic canaries (*Serinus canaria forma domestica*). *Veterinary Microbiology*, 172, 146-156.
- Rubbenstroth, D., Schmidt, V., Rinder, M., Legler, M., Corman, V. M. & Staeheli, P. (2014b). Discovery of a new avian bornavirus genotype in Estrildid finches (*Estrildidae*) in Germany. *Veterinary Microbiology*, 168, 318-323.
- Schildmacher, H. (1932). Über den Einfluss des Salzwassers auf die Entwicklung der Nasendrüsen. *Journal of Ornithology*, 80, 293-299.
- Schiöler, E. L. (1925). *Danmarks Fugle* Band I. Kopenhagen. Zitiert aus Technau, G. (1936). Die Nasendrüse der Vögel - Zugleich ein Beitrag zur Morphologie der Nasenhöhle. *Journal für Ornithologie*, 84, 511-617.
- Schlottau, K., Forth, L., Angstwurm, K., Höper, D., Zecher, D., Liesche, F., Hoffmann, B., Kegel, V., Seehofer, D., Platen, S., Salzberger, B., Liebert, U.G., Niller, H.-H., Schmidt, B., Matiassek, K., Riemenschneider, M. J., Brochhausen, C., Banas, B., Renders, L., Moog, P., Wunderlich, S., Seifert, C. L., Barreiros, A., Rahmel, A., Weiss, J., Tappe, D., Herden, C., Schmidt-Chanasit, J., Schwemmle, M., Rubbenstroth, D., Schlegel, J., Pietsch, C., Hoffmann, D., Jantsch, J., Beer, M. (2018). Fatal encephalitic borna disease virus 1 in solid-organ transplant recipients. *The New England Journal of Medicine*, 379, 1377-1379.
- Schwarze, E., Schröder, L. & Michel, G. (1972). Die Sinnesorgane. In E. Schwarze, L. Schröder & G. Michel (Eds.), *Kompendium der Geflügelanatomie* 2nd edn (pp. 221-232). Jena, Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.
- Scothorne, R. J. (1959). The nasal glands of birds: A histological and histochemical study of the inactive gland in the domestic duck. *Journal of Anatomy*, 93, 246-256.

-
-
- Seeger, J. (2010). Sinnesorgane. In J. Seeger, A. Hoffmann, J. Kacza & T. Stahl (Eds.) *Histologische Übungen für die Tiermedizin*, 2nd edn (pp. 170-178). Hannover: Schlütersche Verlagsgesellschaft.
- Seidel, B. (1988). In V. Schmidt (Ed.), *Augenkrankheiten der Haustiere* 2nd edn. Stuttgart: Enke.
- Shankar, V., Kao, M., Hamir, A. N., Sheng, H., Koprowski, H. & Dietzschold, B. (1992). Kinetics of virus spread and changes in levels of several cytokine mRNAs in the brain after intranasal infection of rats with Borna disease virus. *Journal of virology*, 66, 992-998.
- Shirama, K., Satoh, T., Kitanura, T. & Yamada, J. (1996). The avian Harderian gland: morphology and immunology. *Microscopy Research and Technique*, 34, 16-27.
- Shivaprasad, H. L., Barr, B. C., Woods, L. W., Daft, B. M., Moore, J. D., Kinde, H., Anderson, M. L. & Droual, R. (1995). Spectrum of lesions (pathology) of proventricular dilatation syndrome. In *Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians* (pp. 505-506). Philadelphia, PA.
- Sinowatz, F. & Rodler, D. (2011). *Histologiekurs*. Landsberg: Fred Sinowatz.
- Sinowatz, F. & Hees, H. (2012). Histologie der Organe, Apparate und Systeme. In F. Sinowatz & H. Hees (Eds.), *Histologie - Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie* 5th edn (pp. 189-479). Hofstetten: Fred Sinowatz.
- Slonaker, J. R. (1921). The development of the eye and its accessory parts in the english sparrow (*passer domesticus*). *Journal of Morphology*, 35, 262-357.
- Sprankel, H., Richarz, K., Ludwig, H. & Rott, R. (1978). Behavior alterations in tree shrews (*Tupaia glis*, *Diard 1820*) induced by Borna disease virus. *Medical Microbiology and Immunology*, 165, 1-18.
- Staeheli, P., Rinder, M. & Kaspers, B. (2010). Avian bornavirus associated with fatal disease in psittacine birds. *Journal of virology*, 84, 6269-6275.
- Steinmetz, A., Pees, M., Schmidt, V., Weber, M., Krautwald-Junghanns, M. E. & Oechtering, G. (2008). Blindness as a sign of proventricular dilatation disease in a grey parrot (*Psittacus erithacus erithacus*). *Journal of Small Animal Practice*, 49, 660-662.
- Stitz, L., Bilzer, T. & Planz, O. (2002). The immunopathogenesis of Borna disease virus infection. *Frontiers in Bioscience*, 7, d541-555.
- Survashe, B. D. (1976). *Immunological aspects of avian paraocular glands with particular reference to the Harderian gland of the domestic fowl*. (Ph. D. Thesis), Liverpool.

- Survashe, B. D. & Aitken, I. D. (1978). Immunocompetent cells in avian paraocular glands. *Research in Veterinary Science*, 24, 182-190.
- Technau, G. (1936). Die Nasendrüse der Vögel - Zugleich ein Beitrag zur Morphologie der Nasenhöhle. *Journal für Ornithologie*, 84, 511-617.
- Tizard, I., Guo, J., Turner, D., Payne, S. & Heatley, J. (2013). Studies on the ABV carrier state in healthy cockatiels. In *Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians* (p. 5). Jacksonville, FL.
- Tizard, I., Shivaprasad, H. L., Guo, J., Hameed, S. Ball, J. & Payne, S. (2016). The pathogenesis of proventricular dilatation disease. *Animal Health Research Reviews*, 17, 110-126.
- Villanueva, I., Gray, P., Mirhosseini, N., Payne, S., Hoppes, S., Honkavuori, K. S., Briese, T., Turner, D. & Tizard, I. (2010). The diagnosis of proventricular dilatation disease: Use of a Western blot assay to detect antibodies against avian Bornavirus. *Veterinary microbiology*, 143, 196-201.
- Vollmerhaus, B. (2004). Spezielle Anatomie des Bewegungsapparates. In B. Vollmerhaus (Ed.), *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band V, Anatomie der Vögel*, 3rd edn. Stuttgart: Parey Verlag.
- Vollmerhaus, B. & Sinowatz, F. (1992). Atmungsapparat. In *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band V, Anatomie der Vögel*, 2nd edn. Berlin, Hamburg: Verlag Paul Parey.
- Vollmerhaus, B. & Sinowatz, F. (2004). Atmungsapparat. In B. Vollmerhaus (Ed.), *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band V, Anatomie der Vögel*, 3rd edn (pp. 159-175). Stuttgart: Parey Verlag.
- Weissenböck, H., Bakonyi, T., Sekulin, K., Ehrensperger, F., Doneley, R. J., Dürrwald, R., Hoop, R., Erdélyi, K., Gál, J. & Kolodziejek, J. (2009a). Avian bornaviruses in psittacine birds from Europe and Australia with proventricular dilatation disease. *Emerging Infectious Diseases*, 15, 1453-1459.
- Weissenböck, H., Sekulin, K., Bakonyi, T., Högl, S. & Nowotny, N. (2009b). Novel avian bornavirus in a nonpsittacine species (Canary; *Serinus canaria*) with enteric ganglioneuritis and encephalitis. *Journal of Virology*, 83, 11367-11371.
- Weyrauch, K. D., Schmollich, A. & Plendl, J. (2009). Atmungssystem. In K. D. Weyrauch, A. Schmollich & J. Plendl (Eds.), *Histologie-Kurs für Veterinärmediziner*, 2nd edn (pp. 90-94). Stuttgart: Enke Verlag.
- Wight, P. A., Burns, R. B., Rothwell, B. & Mackenzie, G. M. (1971a). The Harderian gland of the domestic fowl. I. Histology, with reference to the

- genesis of plasma cells and Russell bodies. *Jornal of Anatomy*, 110, 307-315.
- Wight, P. A., Mackenzie, G. M., Rothwell, B. & Burns, R. B. (1971b). The Harderian glands of the domestic fowl. II. Histochemistry. *Journal of Anatomy*, 110, 323-333.
- Williams, D. L. (2012). The avian eye. In D. L. Williams (Ed.), *Ophthalmology of Exotic Pets* Volume 1 (pp. 119-158). Chichester, West Sussex: Wiley-Blackwell.
- Woerpel, R. W. & Roskopf, W.J. (1984). Proventricular dilatation and wasting syndrome: Myenteric Ganglioneuritis and encephalomyelitis of psittacines: An update. In *Proceedings of the Annual Conference of the Association of Avian Veterinarians* (pp. 25-28). Toronto, CA.
- Wünschmann, A., Honkavuori, K., Briese, T., Lipkin, W. I., Shivers, J. & Armien, A. G. (2011). Antigen tissue distribution of Avian bornavirus (ABV) in psittacine birds with natural spontaneous proventricular dilatation disease and ABV genotype 1 infection. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 23, 716-726.
- Wurzinger, L. J. (2005). Atmungsorgane. In J. Carneiro (Ed.) *Histologie* (pp. 283-304). Heidelberg: Springer-Verlag.
- Zimmermann, V., Rinder, M., Kaspers, B., Staeheli, P. & Rubbenstroth, D. (2014). Impact of antigenic diversity on laboratory diagnosis of avian bornavirus infection in birds. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 26, 769-777.
- Zöller, B., Redman-Müller, I., Nanda, I., Guttenbach, M., Dosch, E., Schmid, M., Zoorob, R. & Jungwirth, C. (2000). Sequence comparison of avian interferon regulatory factors and identification of the avian CEC-32 cell as a quail cell line. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 20, 711-717.

IX. Tabellen

9.1. Tabelle A, Detaillierte Übersicht über die einzelnen untersuchten Papageienvögel

Mit Alter, Geschlecht, Todestag, Euthanasiebegündung, andere Erkrankungen außer Bornavirus-Infektionen sowie der Entnahmezeit der Organproben bis zum Beginn der Fixation in Zamboni-Medium (Ausnahme Kongo-Graupapageien (*Psittacus erithacus*) #33404 und #45040, diese Vögel wurden in Formalin fixiert).

Vetera Nr.	Tierart	Alter in Jahren	Geschlecht	Todestag	Euthanasiegrund	Borna- virus- status	sonstige Krankheiten	Zeit bis Fixation in Stunden
118	Hybridara	7	weiblich	20.01.2015	tot aufgefunden	positiv	negativ	12
3035	Wellensittich	11	männlich	28.07.2014	Megabakteriose	negativ	negativ	0,25
7044	Kongo- Graupapagei	8	weiblich	23.07.2015	Bornainfektion	positiv	Zinkvergiftung	1
17160	Edelpapagei	13,5	weiblich	14.03.2014	Legenot	negativ	negativ	0,5
18784	Blaustirn- Amazone	8	männlich	16.07.2014	Oberschnabelfraktur	positiv	negativ	0,25
18899	Wellensittich	5	männlich	01.04.2015	Dyspnoe	negativ	negativ	0,5
19957	Wellensittich	4	männlich	17.07.2015	Räumung	negativ	negativ	1
19995	Wellensittich	3	weiblich	22.12.2014	Legenot	negativ	negativ	2,5
20001	Wellensittich	4	männlich	17.07.2015	Räumung	negativ	negativ	0,5
20009	Wellensittich	4	weiblich	23.07.2015	Räumung	negativ	negativ	0,25
20013	Wellensittich	4	männlich	23.07.2015	Räumung	negativ	negativ	0,5
20014	Wellensittich	4	männlich	23.07.2015	Räumung	negativ	negativ	0,75
20019	Wellensittich	4	männlich	23.07.2015	Räumung	negativ	negativ	1

20639	Wellensittich	3	unbekannt	16.09.2014	Nephropathie	negativ	negativ	2
20847	Kuba-Amazone	7	weiblich	03.02.2015	tot aufgefunden	positiv	Aspergillose	10
21447	Wellensittich	9	männlich	14.03.2014	Hodentumor	negativ	Zinkvergiftung	1
21682	Wellensittich	10	männlich	13.01.2015	Juckreiz	negativ	negativ	0,75
22331	Wellensittich	3	männlich	28.07.2015	Räumung	negativ	negativ	0,5
22844	Wellensittich	3	weiblich	08.04.2015	Anorexie	negativ	Vomitus	1
23205	Wellensittich	3	männlich	20.07.2015	Räumung	negativ	negativ	0,5
23525	Wellensittich	7	männlich	28.07.2014	Hodentumor	negativ	negativ	0,25
23910	Wellensittich	3	männlich	23.07.2015	Räumung	negativ	negativ	2,5
23911	Wellensittich	3	männlich	17.07.2015	Räumung	negativ	negativ	0,5
23913	Wellensittich	3	männlich	17.07.2015	Räumung	negativ	negativ	1
23915	Wellensittich	3	männlich	28.07.2015	Räumung	negativ	negativ	0,75
23916	Wellensittich	3	männlich	28.07.2015	Räumung	negativ	negativ	0,5
23917	Wellensittich	3	männlich	28.07.2015	Räumung	negativ	negativ	0,75
23919	Wellensittich	3	männlich	23.07.2015	Räumung	negativ	negativ	3
23920	Wellensittich	3	männlich	23.07.2015	Räumung	negativ	negativ	3
23921	Wellensittich	3	männlich	28.07.2015	Räumung	negativ	negativ	1
23922	Wellensittich	3	männlich	17.07.2015	Räumung	negativ	negativ	0,5
23925	Wellensittich	3	männlich	28.07.2015	Räumung	negativ	negativ	1
23926	Wellensittich	1,5	weiblich	04.02.2014	Kachexie, Dyspnoe	negativ	negativ	2
23927	Wellensittich	3	männlich	17.07.2015	Räumung	negativ	negativ	1
23928	Wellensittich	3	männlich	28.07.2015	Räumung	negativ	negativ	1,5
24527	Wellensittich	2	männlich	28.07.2015	Räumung	negativ	negativ	1,25
25191	Wellensittich	2	männlich	17.07.2015	Räumung	negativ	negativ	0,75
25193	Wellensittich	2	männlich	23.07.2015	Räumung	negativ	negativ	0,75
25194	Wellensittich	2	männlich	20.07.2015	Räumung	negativ	negativ	0,5

25693	Nymphensittich	3,25	männlich	17.04.2014	Herzstillstand in Augenoperation	negativ	Zinkvergiftung	1
25956	Wellensittich	2	männlich	28.07.2015	Räumung	negativ	negativ	0,25
25957	Wellensittich	1	weiblich	03.11.2014	Apathie	negativ	Eidotterperitonitis	2
26615	Wellensittich	2	männlich	20.07.2015	Räumung	negativ	negativ	0,75
26616	Wellensittich	2	weiblich	23.07.2015	Räumung	negativ	negativ	2,5
26621	Wellensittich	2	weiblich	17.07.2015	Räumung	negativ	negativ	0,5
26622	Wellensittich	2	weiblich	28.07.2015	Räumung	negativ	negativ	0,25
27144	Granada-Amazone	10	männlich	11.11.2014	Bornavirus-Infektion	positiv	negativ	2,5
27913	Wellensittich	7	weiblich	25.03.2015	Dyspnoe	negativ	negativ	5
28616	Nymphensittich	3	männlich	09.08.2015	ZNSstörung	negativ	negativ	0,25
29716	Kongo- Graupapagei	37,5	männlich	16.07.2014	Hepatopathie	negativ	Zinkvergiftung	0,75
29823	Kongo- Graupapagei	0,5	männlich	21.05.2014	Hydrocephalus	negativ	Skoliose	1
29851	Inka-Kakadu	adult	männlich	14.01.2014	Erstickt	negativ	negativ	15
29960	PrachtroSELLa	10	unbekannt	10.02.2014	Bornavirus-Infektion	positiv	Circovirus, Adenovirus, PBFD	1
30010	Rostkappenpapagei	3	männlich	31.01.2014	tot aufgefunden	negativ	negativ	36
30215	Gelbbrustara	0,5	weiblich	28.02.2014	Bornavirus-Infektion	positiv	Zinkvergiftung	4
30218	Wellensittich	1	männlich	17.07.2015	Räumung	negativ	negativ	1
30219	Wellensittich	1	weiblich	17.07.2015	Räumung	negativ	negativ	1
30226	Wellensittich	0,75	männlich	25.02.2014	Megabakteriose	negativ	negativ	1
30288	Wellensittich	5,5	männlich	04.03.2014	Nierentumor	negativ	negativ	1
30298	Wellensittich	10,5	weiblich	04.03.2014	Bürzeldrüsentumor	negativ	negativ	2
30306	Edelpapagei	3,5	weiblich	03.03.2014	tot aufgefunden	negativ	Nephropathie, Hautekzem	48

30360	Nymphensittich	13	weiblich	13.03.2014	Anflugtrauma	negativ	negativ	4
30449	Wellensittich	1,5	unbekannt	20.03.2014	Megabakteriose	negativ	negativ	0,5
30520	Wellensittich	3,5	weiblich	28.03.2014	Nierentumor	negativ	negativ	1
30657	Wellensittich	6,25	weiblich	10.04.2014	Lipom	negativ	negativ	2
30667	Wellensittich	3,25	männlich	10.04.2014	Megabakteriose	negativ	negativ	1
30668	Ziegensittich	5,25	weiblich	10.04.2014	Tuberkulose	negativ	negativ	1
30686	Ziegensittich	2	weiblich	03.02.2015	Legenot	negativ	Hepatose	0,5
31124	Kongo-Graupapagei	0,5	männlich	21.05.2014	Hydrocephalus	negativ	Skoliose	0,5
31268	Nymphensittich	5	weiblich	11.07.2014	tot aufgefunden	negativ	Sepsis	2
31735	Nymphensittich	adult	weiblich	17.06.2014	Tuberkulose	negativ	negativ	24
31831	Wellensittich	adult	weiblich	27.06.2014	Megabakteriose	negativ	Nephromegalie	0,5
31865	Wellensittich	5	männlich	28.06.2014	Prolaps	negativ	negativ	2
31979	Nymphensittich	2	männlich	05.07.2014	Nepropathie	negativ	Zinkvergiftung	0,5
32241	Wellensittich	juveni 1	weiblich	22.07.2014	Maxillafraktur	negativ	negativ	0,25
32247	Wellensittich	8	unbekannt	22.07.2014	Nierentumor	negativ	negativ	1,5
32270	Venezuela-Amazone	35	männlich	23.07.2014	Nierenversagen	negativ	negativ	0,5
32600	Wellensittich	8	weiblich	14.08.2014	Knocheninfektion	negativ	ZNS-Störung	1
32605	Wellensittich	3	männlich	15.08.2014	Exitus	negativ	negativ	0,5
32724	Kongo-Graupapagei	adult	männlich	28.08.2014	Aspergillose	negativ	negativ	0,25
32778	Edelpapagei	0,25	weiblich	24.08.2014	Schädeltrauma	negativ	negativ	36
32823	Unzertrennlicher	10	unbekannt	05.09.2014	Erbrechen	negativ	negativ	1
32828	Nymphensittich	6	weiblich	31.08.2014	Fraktur	negativ	negativ	0,5
32951	Unzertrennlicher	6	weiblich	16.09.2014	Augentumor	negativ	Tuberkulose	1

33402	Kongo-Graupapagei	1,5	männlich	30.10.2015	Bornainfektion	positiv	negativ	2,5
33404	Kongo-Graupapagei	2,5	weiblich	28.11.2016	Bornainfektion	positiv	negativ	3,5
33415	Wellensittich	adult	männlich	24.10.2014	Ständerlähmung	negativ	negativ	0,5
33464	Wellensittich	3	weiblich	29.10.2014	Ständerlähmung	negativ	Nephropathie	0,25
33721	Wellensittich	1	weiblich	20.07.2015	Räumung	negativ	negativ	1
33890	Wellensittich	adult	männlich	05.12.2014	Arthrosen	negativ	Nephropathie	1
34070	Ziegensittich	adult	weiblich	16.01.2015	Legenot	negativ	negativ	0,5
34084	Wellensittich	15	männlich	30.12.2014	Arthrosen	negativ	Nephropathie	0,5
34319	Wellensittich	5	männlich	26.01.2015	Tumor Flügel	negativ	negativ	0,5
34349	Kongo-Graupapagei	2	weiblich	29.01.2015	Apathie	positiv	negativ	24
34424	Wellensittich	8	männlich	08.02.2015	Hodentumor	negativ	negativ	0,5
34580	Nymphensittich	adult	männlich	23.02.2015	Exitus	negativ	negativ	0,25
34664	Zwergara	2	männlich	03.03.2015	Trauma	negativ	negativ	0,75
34789	Schwarzohrpapag.	4	männlich	15.03.2015	tot aufgefunden	negativ	Lungenmykose	11
34940	Wellensittich	4	männlich	29.03.2015	Anfälle	negativ	Hepatose	0,5
34995	Wellensittich	adult	männlich	14.04.2015	Circovirus	negativ	Megabakteriose	0,5
35126	Wellensittich	adult	weiblich	20.07.2015	Räumung	negativ	negativ	1
35834	Wellensittich	0,75	männlich	08.06.2015	Kachexie	negativ	Megabakteriose	0,25
35987	Wellensittich	9	weiblich	22.06.2015	Legedarmhypertroph.	negativ	negativ	0,25
36104	Wellensittich	adult	weiblich	22.06.2015	Trichomonaden	negativ	negativ	0,5
36243	Kongo-Graupapagei	20	männlich	02.07.2015	tot aufgefunden	negativ	Kardiomyopathie, Zinkvergiftung	20
36251	Timneh-Graupapagei	30	männlich	04.07.2015	Aspergillose	negativ	negativ	4
36378	Wellensittich	adult	weiblich	23.07.2015	Räumung	negativ	negativ	1,5

36539	Nymphensittich	4	weiblich	20.07.2015	Exitus	negativ	negativ	0,75
36618	Nymphensittich	1	männlich	24.07.2015	tot aufgefunden	negativ	negativ	12
36789	Kongo-Graupapagei	18	weiblich	30.07.2015	Legenot	negativ	Hepatose	24
36790	Erzlori	3	weiblich	31.07.2015	tot aufgefunden	negativ	Obstipation	15
36829	Wellensittich	1	weiblich	06.08.2015	Hepatose	negativ	Flagellaten+ Hefen	3
36854	Inka-Kakadu	adult	männlich	05.08.2015	Tod bei Tracheoskopie	negativ	negativ	4
36880	Kongo-Graupapagei	5	männlich	05.08.2015	tot aufgefunden	negativ	negativ	24
37035	Wellensittich	9	weiblich	15.08.2015	Aphie, Anorexie	negativ	negativ	0,5
37453	Sperlingspapagei	5	weiblich	15.09.2015	tot aufgefunden	negativ	Tuberkulose	12
37463	Kongo-Graupapagei	18	weiblich	17.09.2015	Hepathopathie	negativ	negativ	96
37599	Dunelroter Ara	8	männlich	05.10.2015	innere Blutungen	negativ	Capillarien	0,75
37676	Blaustirn-Amazone	adult	männlich	07.10.2015	tot aufgefunden	positiv	Kardiopathie, Aspergillose	11
37929	Kongo-Graupapagei	10	männlich	27.10.2015	Aspergillose	positiv	negativ	13
38012	Sonnensittich	3	männlich	04.11.2015	tot bei Narkose	negativ	Kardiomegalie	5
38035	Ziegensittich	2	männlich	06.11.2015	bei Therapie gestorben	negativ	Nepropathie	3
38038	Soldatenara	0,75	männlich	06.11.2015	Fraktur	negativ	Kümmerer	2
38044	Stellalori	2	männlich	05.11.2015	tot aufgefunden	negativ	negativ	24
38159	Grüner Kongopapagei	8	männlich	12.11.2015	tot aufgefunden	negativ	Aspergillose	24
38435	Jamaika-Amazone	adult	männlich	10.12.2015	Tuberkulose	negativ	negativ	24
38763	Kongo-Graupapagei	adult	männlich	10.01.2016	tot aufgefunden	positiv	Hypocalcämie-syndrom	9

IX. Tabellen

38871	Rosa-Kakadu	10	weiblich	18.01.2016	tot aufgefunden	negativ	Pneumonie	24
43830	Baustirnamazone	10	weiblich	19.08.2016	tot aufgefunden	negativ	Aspergillose	12
45040	Kongo- Graupapagei	19	weiblich	28.11.2016	Bornainfektion	positiv	negativ	0,5

9.2. Tabelle B, Übersicht der klinischen Daten der Bornavirus-positiven Papageienvögel

Mit Art, Alter, Geschlecht, Datum der Erstvorstellung in der Klinik, erster positiver Bornavirusnachweis, Todestag und nachgewiesene Mindestinfektionsdauer mit Bornaviren, also die Zeit zwischen Diagnosestellung und Tod.

Vetera- Nummer	Tierart	Alter in Jahren	Geschlecht	Datum der Erstvorstellung	Datum positiver Bornabefund	Todestag	Mindestinfektionsdauer mit Bornaviren
118	Hybridara	adult	weiblich	19.11.2007	20.10.2010	20.01.2015	4,25 Jahre
7044	Kongo- Graupapagei	8,5	weiblich	03.09.2008	07.03.2011	23.07.2015	4,25 Jahre
18784	Blaustirn- Amazone	8,5	männlich	28.06.2011	05.11.2012	17.07.2014	1,75 Jahre
20847	Kuba-Amazone	7	weiblich	04.12.2011	05.12.2011	04.02.2015	3,25 Jahre
27144	Granada-Amazone	11	männlich	31.05.2013	04.06.2013	11.11.2014	1,5 Jahre
29960	Prachtrosella	10	unbekannt	28.01.2014	12.02.2014	10.02.2014	0 Tage
30215	Gelbbrustara	0,5	weiblich	22.02.2014	24.02.2014	28.02.2014	4 Tage
33402	Kongo- Graupapagei	1,5	männlich	24.10.2014	28.10.2015	30.10.2015	2 Tage
33404	Kongo- Graupapagei	2,5	weiblich	24.10.2014	29.11.2016	28.11.2016	0 Tage
34349	Kongo- Graupapagei	2	weiblich	Einsendung Pathologie	30.01.2015	nicht vermerkt	0 Tage
37676	Blaustirn- Amazone	adult	männlich	04.10.2015	07.10.2015	07.10.2015	1 Tag
37929	Kongo- Graupapagei	11	männlich	26.10.2015	27.10.2015	27.10.2015	1 Tag
38763	Kongo- Graupapagei	adult	männlich	09.01.2016	12.01.2016	10.01.2016	0 Tage

IX. Tabellen

45040	Kongo- Graupapagei	19	weiblich	25.11.2016	28.11.2016	28.11.2016	1 Tag
-------	-----------------------	----	----------	------------	------------	------------	-------

9.3. Tabelle C, Angefertigte Schnittdicken bei den einzelnen Tieren und den einzelnen Blöcken

Wenn eine Abweichung von den 4µm notwendig war. Angaben in µm; Bsp. „1-4 7“: Schnitte 1 ,2 ,3 ,4 jeweils 7 µm geschnitten; X= Schnittdicke 4 µm; RSH: respiratorische Schleimhaut; AH: Augenhöhle; HD: Hardersche Drüse; re: rechts; li: links

Vetera Nr.	Tierart	RSH re	RSH li	Mitte re	Mitte li	AH re	AH li	HD re	HD li	Hirn
118	Hybridara	x		10		10				
7044	Kongo-Graupapagei	10			10	10		x	x	x
18784	Blaustirn-Amazone	x		x		x				5
20001	Wellensittich	10				10				
20847	Kuba-Amazone	1-4 7, 5-7 6, 8-30 10		10		1-3 10, 4-18 7, 19-20 10				x
27144	Granada-Amazone	10			10		10			
28616	Nymphensittich	10				10				
29716	Kongo-Graupapagei	10					10			x
29823	Kongo-Graupapagei	10		10		10	10			10
29960	Prachtrosella	x	x	x		x				10
30218	Wellensittich	10				10				
30686	Ziegensittich	10				10				
32270	Venezuela-Amazone	10			10	10	10			x
32828	Nymphensittich	10				10				
33402	Kongo-Graupapagei	x		6	6	8			x	x

IX. Tabellen

33404	Kongo-Graupapagei	10				10	10		x	
34349	Kongo-Graupapagei	10		x, 41-58 10		x				10
34424	Wellensittich	x, 11-16 10				5				
34580	Nymphensittich	x		x, 21-23 10						
34664	Zwergara	x, 11-16 10		x		x		x	x	x
34789	Schwarzohrpapagei	10		10		10		x	x	10
36243	Kongo-Graupapagei	10		x, 116- 118 10		x		x	x	10
36251	Timneh-Graupapagei	10		x, 21-26 10	x, 11-13 10	x, 21-26 10		x	x	x
36539	Nymphensittich	10				10		x		10
36854	Inka-Kakadu	10		x		10	10			
37599	Dunkelroter Ara	10		x	1-3 10, 4-27 5	10	10	x	7	x
37676	Blaustirn-Amazone	5			10	1-3 10, 4-6 5		x	x	x
37929	Kongo-Graupapagei	10			10	10				5
38012	Sonnensittich	10		10		10	10	x		
38035	Ziegensittich	10				10	10	x	x	5
38044	Stellalori	10		10		10				5
38435	Jamaika-Amazone							10	x	
38763	Kongo-Graupapagei	10		10		10		10	x	x
43830	Baustirnamazone	10		10		10				10

IX. Tabellen

45040	Kongo- Graupapagei	1-10 10, 11-13 7	10	1-180 10, 181-200 7	10	7				
-------	-----------------------	---------------------	----	------------------------	----	---	--	--	--	--

X. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 a und b: respiratorisches Epithel von Wellensittich #19995

Abbildung 2a: respiratorisches Epithel von Nymphensittich #25693

Abbildung 2b: respiratorisches Epithel von Nymphensittich #34580

Abbildung 3a: respiratorisches Epithel und Nasendrüse von Ziegensittich #38035

Abbildung 3b: respiratorisches Epithel von Ziegensittich #30668

Abbildung 4 a und b: respiratorisches Epithel von Schwarzohrpapagei #34789

Abbildung 5 a bis c: Übergang kutane Schleimhaut in respiratorisches Epithel von Kongo-Graupapagei #45040

Abbildung 6 a und b: respiratorisches Epithel von Kongo-Graupapagei #29823

Abbildung 6c: respiratorisches Epithel von Kongo-Graupapagei #45040

Abbildung 7 a und b: respiratorisches Epithel von Kongo-Graupapagei #38763

Abbildung 7c: respiratorisches Epithel von Kongo-Graupapagei #37929

Abbildung 7d: hyaliner Knorpel von Kongo-Graupapagei #37929

Abbildung 8 a bis c: respiratorisches Epithel von Venezuela-Amazone #32270

Abbildung 8d: respiratorisches Epithel von Kuba-Amazone #20847

Abbildung 9 a bis d: respiratorisches Epithel von Kuba-Amazone #20847

Abbildung 10 a bis c: respiratorisches Epithel von Granada-Amazone #27144

Abbildung 10d: respiratorisches Epithel von Blaustirn-Amazone #37676

Abbildung 11 a bis c: respiratorisches Epithel von Hybridara #118

Abbildung 12: respiratorisches Epithel von Hybridara #118

Abbildung 13 a bis d: respiratorisches Epithel von Inkakakadu #36854

Abbildung 14: Nasendrüse von Nymphensittich #36539

Abbildung 15 a und b: Nasendrüse von Ziegensittich #38035

Abbildung 16 a und b: Nasendrüse von Schwarzohrpapagei #34789

Abbildung 17a: Nasendrüse von Kongo-Graupapagei #29823

Abbildung 17b: Nasendrüse von Kongo-Graupapagei #38763

Abbildung 17c: Nasendrüse von Kongo-Graupapagei #34349

Abbildung 18 a und b: Nasendrüse von Kongo-Graupapagei #37929

Abbildung 19 a und b: Nasendrüse von Venezuela-Amazone #32270

Abbildung 19c: Nasendrüse von Blaustirn-Amazone #18784

Abbildung 20 a bis c: Nasendrüse von Blaustirn-Amazone #18784

Abbildung 20d: Nasendrüse von Blaustirn-Amazone #37676

Abbildung 21 a bis c: Nasendrüse von Zwergara #34664

Abbildung 22 a und b: Nasendrüse von Hybridara #118

Abbildung 23 a und b: Nasendrüse von Inkakakadu #36854

Abbildung 24: olfaktorisches Epithel von Wellensittich #36539

Abbildung 25 a bis d: Riechnervenaustritt in Nasenhöhle und olfaktorisches Epithel von Schwarzohrpapagei #34789

Abbildung 26 a bis d: Riechnervenaustritt in Nasenhöhle und olfaktorisches Epithel von Kongo-Graupapagei #38736

Abbildung 27 a bis d: Riechnervenaustritt in Nasenhöhle und olfaktorisches Epithel von Kongo-Graupapagei #38736

Abbildung 28 a bis d: Riechnervenaustritt in Nasenhöhle und olfaktorisches Epithel von Kongo-Graupapagei #45040

Abbildung 28e: lateraler Bereich des olfaktorischen Epithels von Kongo-Graupapagei #45040

Abbildung 28f: Großhirn von Kongo-Graupapagei #45040

Abbildung 29a: Tränendrüse und Hardersche Drüse von Wellensittich #30675

Abbildung 29b: Tränendrüse von Wellensittich # 27913

Abbildung 30a: Tränendrüse von Nymphensittich #36539

Abbildung 30b: Tränendrüse von Nymphensittich # 32828

Abbildung 31 a und b: Tränendrüse von Kongo-Graupapagei # 29716

Abbildung 31c: Tränendrüse von Kongo-Graupapagei #7044

Abbildung 31d: Tränendrüse von Kongo-Graupapagei #37929

Abbildung 32 a und b: Tränendrüse von Blaustirn-Amazone #43830

Abbildung 32 c und d: Tränendrüse von Kuba-Amazone #20847

Abbildung 33: Tränendrüse vom Dunkelroten Ara #37599

Abbildung 34a: *Glandula membranae nictitantis* von Wellensittich #20001

Abbildung 34b: Hardersche Drüse von Wellensittich #34424

Abbildung 35a: *Glandula membranae nictitantis* von Nymphensittich #36539

Abbildung 35b: Hardersche Drüse von Nymphensittich #32828

Abbildung 36 a und b: *Glandula membranae nictitantis* von Ziegensittich # 38035

Abbildung 37 a und b: Hardersche Drüse von Prachtrosella #29960

Abbildung 38a: Hardersche Drüse und Tränendrüse von Prachtrosella #29960

Abbildung 38b: Großhirn von Prachtrosella #29960

Abbildung 39 a und b: Hardersche Drüse von Schwarzohrpapagei # 34789

Abbildung 40a: *Glandula membranae nictitantis*, Tränendrüse und Sehnerv von Kongo-Graupapagei #34349

Abbildung 40b: Hardersche Drüse von Kongo-Graupapagei #29823

Abbildung 40 c und d: *Glandula membranae nictitantis* von Kongo-Graupapagei #38763

Abbildung 41a: Hardersche Drüse, Tränendrüse und Sehnerv von Blaustirn-Amazone #37676

Abbildung 41 b bis d: *Glandula membranae nictitantis* von Jamaika-Amazone #38435

Abbildung 42 a und b: Hardersche Drüse von Hybridara #118

Abbildung 42 c und d: *Glandula membranae nictitantis* von Zwergara #34664

Abbildung 42 e und f: Hardersche Drüse von Hybridara #118

Abbildung 43 a und b: *Glandula membranae nictitantis* von Inkakakadu #36854

XI. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der in der vorliegenden Studie untersuchten 130 Papageienvögel, nach Art, wissenschaftlichem Namen, der jeweiligen Anzahl und mit Bornavirus-infizierten Tiere.

Tabelle 2: Übersicht über die Papageienvögel, von denen nicht der gesamte Tierkörper zur Untersuchung vorlag mit Angabe des vorhandenen Untersuchungsmaterials (HD, Hardersche Drüse).

Tabelle 3: Schritte zur Paraffinierung der entkalkten Gewebeblöcke und der Weichteilgewebe mit Harderschen Drüsen im Spin Tissue Processor Microtom STP 120 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) mit durchlaufenem Medium und Zeitdauer.

Tabelle 4: Arbeitsschritte zur Färbung mit Hämatoxylin-Eosin.

Tabelle 5: Arbeitsschritte zum immunhistochemischen Nachweis von PaBV-N-Protein in histologischen Schnitten von Papageienvögeln.

Tabelle 6: Arbeitsschritte der β -III-Tubulin-Färbung zum Nachweis der Riechnerven im Bereich der Riechschleimhaut von Psittaziden.

Im Anhang:

Tabelle A: Detaillierte Übersicht über die einzelnen untersuchten Papageienvögel mit Alter, Geschlecht, Euthanasiebeggründung, andere Erkrankungen außer Bornavirus-Infektionen sowie der Entnahmezeit der Organproben bis zum Beginn der Fixation in Zamboni-Medium (Ausnahme Kongo-Graupapageien (*Psittacus erithacus*) #33404 und #45040, diese Vögel wurden in Formalin fixiert).

Tabelle B: Übersicht der klinischen Daten der Bornavirus-positiven Papageienvögel mit Art, Alter, Datum der Erstvorstellung in der Klinik, erster positiver Bornavirusnachweis, Todestag und Mindestdauer der Bornavirus-Infektion, also die Zeit zwischen Diagnosestellung und Tod.

Tabelle C: Angefertigte Schnittdicken bei den einzelnen Tieren und den einzelnen Blöcken, wenn eine Abweichung von den 4 μ m notwendig war. Angaben in μ m; Bsp. „1-4 7“: Schnitte 1, 2, 3, 4 jeweils 7 μ m geschnitten; X= Schnittdicke 4 μ m;

RSH: respiratorische Schleimhaut; AH: Augenhöhle; HD: Hardersche Drüse; re: rechts; li: links

XII. Danksagung

Schlussendlich geht mein herzlicher Dank an alle, die die Durchführung dieser Arbeit ermöglicht haben.

Ganz besonders möchte ich Herrn Prof. Rüdiger Korb für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die Überlassung des Themas danken.

Des Weiteren ein großes Dankeschön an Frau PD Monika Rinder für die Heranführung an das Thema, die Beschaffung von rarer Literatur und die konstruktive Kritik.

Außerdem geht mein Dank an die wissenschaftlichen Mitarbeiter der Vogelklinik für die vielfältige Unterstützung beim Probensammeln und die zeitnahen Anrufe. Speziell an Miriam Schiller für die Unterstützung in der Pathologie und Histologie bei der Blockherstellung, sowie Lisa Koch und Dana Härtner für die Durchführungen der molekularbiologischen Untersuchungen in der virologischen Abteilung.

Zusätzliche möchte ich mich ganz herzlich bei dem Institut der Neuroanatomie, speziell dem ganzen Lehrstuhl II, bedanken. Vielen Dank liebe Labormäuse (ganz besonders Beate, Sabine und Astrid), dass Ihr mir Euer Know-How und Schlüssel geliehen habt, immer jedes Protokoll sofort rausgesucht habt und auch für private Themen immer ein offenes Ohr hattet. Unsere Über-Schrank-Gespräche am Mikrotom sind legendär. Ich durfte mich mit meinem Material über alle Arbeitsflächen und Schränke ausbreiten, wo kein Platz war, wurde welcher geschaffen. Liebe Maren, ohne Deine ständigen Nachfragen wäre ich vermutlich immer noch planlos im weiten Raum unterwegs. Euer Interesse für meine Ergebnisse hat mich immer angespornt. Großer Dank auch an Prof. Milz für die Unterstützung bei der Fototechnik, der Computer hat einfach mehr Respekt vor Ihnen als vor mir. Die Kuchen- und Sandwichflatrate war das Mindeste, was ich für Euch tun konnte. Und nein Herr Prof. Milz, der Nusskuchen ist immer noch nicht selbst gebacken.

Ohne Euch hätte ich sicherlich irgendwann das Handtuch geworfen.

Zusätzlich danke ich meinen Großeltern, Sabrina, Roland und meiner Spielegruppe für Ihr großes Interesse an meiner Arbeit. Obwohl ihr fachlich nicht wirklich involviert wart, seid Ihr mir emotional eine große Stütze gewesen und habt immer nach dem neusten Stand gefragt.

Meinem Freund Clemens danke ich besonders für seine Unterstützung, sein Verständnis für meine Launen und die technische Hilfestellung in der Endphase dieser Arbeit. Dieses verflixte Inhaltsverzeichnis wollte einfach nicht was ich brauchte...